

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Effets de l'hypoxie intermittente combinée à un environnement inflammatoire sur le phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules endothéliales tumorales

Tellier, Céline

Award date:
2011

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Effets de l'hypoxie intermittente combinée à un environnement inflammatoire
sur le phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules
endothéliales tumorales**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Céline TELLIER

Janvier 2011

**Effets de l'hypoxie intermittente combinée à un environnement inflammatoire
sur le phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules
endothéliales tumorales**

TELLIER Céline

Résumé

Le cancer constitue la seconde cause mondiale de mortalité avec 7,6 millions de décès annuels. Cette maladie implique de nombreuses interactions hétérotypiques essentielles à sa progression. Les cellules endothéliales constituant le réseau vasculaire tumoral jouent un rôle critique pour la survie et le développement de la tumeur ainsi que pour la dissémination des métastases. Ces cellules sont soumises à deux facteurs environnementaux principaux, à savoir l'hypoxie intermittente et l'inflammation, modifiant leurs fonctions. Ces deux caractéristiques vont induire l'expression de gènes menant à l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique par les cellules endothéliales. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux modifications transcriptomiques et protéomiques induites par l'hypoxie intermittente en présence ou en absence de TNF- α en comparaison à la normoxie ou à l'hypoxie chronique. Nous avons tout d'abord étudié l'expression en ARNm de gènes cibles impliqués dans l'inflammation et/ou l'angiogenèse. Quatre de ces gènes, ICAM-1, IL-6, IL-8 et bFGF, ont montré une expression en ARNm augmentée en HI. En parallèle, l'expression de ICAM-1 induite par le TNF- α est stabilisée au cours du temps de réoxygénation lorsque les cellules endothéliales ont été exposées à une HI. La sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF est également augmentée en HI en présence de TNF- α . Un marquage en immunofluorescence montre une augmentation de l'abondance du bFGF en HI avec une translocalisation nucléaire partielle de cette protéine. La seconde grande approche de ce travail a été d'étudier l'activité d'enzymes présentes dans le milieu et capables de dégrader la matrice extracellulaire. Nous avons identifié la présence de MMP-9, en complexe ou non, ainsi que de MMP-2, mais leur activité n'augmente pas en HI en présence ou non de TNF- α . Par contre, une enzyme de poids moléculaire apparent d'environ 70 kDa, que nous n'avons pas réussi à identifier, a une activité augmentée en HI en absence de TNF- α . Nous avons également montré une augmentation de l'expression en ARNm de PTX3 en HI seule, et davantage en HI en présence de TNF- α . De plus, l'effet pro-angiogénique global de l'HI fut confirmé par l'observation d'une augmentation de la migration des cellules endothéliales tandis que le TNF- α n'induit quasiment pas d'effet. L'ensemble de ces résultats montre donc que l'hypoxie intermittente en combinaison avec un environnement inflammatoire engendre la mise en place d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules endothéliales. Ce phénotype promeut la progression tumorale via l'amplification de l'inflammation du site tumoral, via l'angiogenèse et via l'augmentation de la survie et de la prolifération des cellules tumorales.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2011

Promoteur: C. Michiels

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont énormément aidée et soutenue durant ces dix mois et qui ont fait de cette expérience une réussite. Puissent ces lignes être le symbole de ma profonde gratitude.

Je commencerai tout d'abord par remercier Thierry Arnould ainsi que tous les autres seniors de l'URBC, Florence Chainiaux, Carine Michiels, Martine Raes, Patsy Renard et Olivier Toussaint, qui m'ont si bien accueillie, qui m'ont honorée de leur confiance en me donnant la chance de réaliser ce mémoire au sein du laboratoire et qui ont toujours été présents pour répondre à mes questions.

Merci à l'équipe HIF, Déborah, Audrey, Annick, Benoît, les deux Lio, Hélène, Marie, Maude, pour leurs bonnes idées, leur écoute durant toutes les réunions, leur bonne humeur... « ça c'est de l'équipe ! ». Merci à tous les autres chercheurs du labo pour leurs précieux conseils, leur sympathie et qui ont fait que la vie en URBC est avant tout source de rires et d'entraide ! Merci également à Anne et à tous les techniciens, que je qualifierai de « hors pair », qui m'ont tous apporté une aide attentionnée. Merci donc à Andrée, Antoine, Martine, Noëlle, Catherine et Guy, et un immense merci à Edouard pour sa sagesse, sa gentillesse et ses nombreuses solutions ! Merci également à Marc pour ses analyses rapides, son aide et son humour sans faille.

Enfin, merci aux autres mémorants et spécialement à ceux du même bureau pour les bons moments passés ensemble et leur soutien perpétuel dans les moments difficiles. Merci à Alexia et à François, mes deux co-équipiers. Merci à Anaïs, Benoît et Edith pour leurs conseils avisés, leurs bonnes idées et les nombreuses discussions interminables sur des sujets aussi bien scientifiques que purement amicaux et fantaisistes !

The last but not least, et je dirais même plus « le meilleur pour la fin », je voudrais tout particulièrement remercier la personne qui a sans aucun doute été la plus importante et la plus influente pour moi, qui m'a toujours fait croire en mon travail et qui a cru en moi, et qui a fait que cette année s'est si bien déroulée. Je remercie donc de tout cœur ma promotrice Carine Michiels pour sa patience, son aide, son soutien, sa disponibilité, ses corrections rigoureuses et rapides, ses conseils précieux et son écoute tout au long de cette année.

Je terminerai ces remerciements en me tournant vers mes proches, mes amis et particulièrement Laurent, mon appui essentiel.

Céline

ABREVIATIONS

2-OG	2-OxoGlutarate
4E-BP1	eIF-4E Binding Protein 1
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPK	AMP Kinase
AP-1	Activator Protein-1
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
APS	Ammonium PerSulfate
ARD1	Arrest-Defective 1
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCL-2	B-cell CLL/Lymphoma 2
bFGF = FGF2	basic Fibroblast Growth Factor
Bid	Bcl-2-interacting domain
BSA	Bovine Serum Albumin
CAF	Carcinoma-Associated Fibroblast
CBP	CREB-Binding Protein
CE	Cellule Endothéliale
COX-2	CycloOXygénase-2
CREB	Cyclic AMP-Response Element Binding protein
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
Ct	Cycle threshold
DC	Dendritic Cell
DD	Death Domain
DHG-L1	Dulbecco's Modified Eagle's High Glucose
DIABLO	Direct IAP Binding Protein with LOw pI
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	DiMethyl SulfOxide
dNTP	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
EDTA	Ethylen Diamine Tetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
Egr-1	Early growth response-1
EGTA	Ethylen Glycol Tetraacetic Acid
eIF-4E	eukaryotic translation Initiation Factor 4E
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
eNOS = NOS3	endothelial Nitric Oxide Synthase
EPC	Endothelial Precursor Cell
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase
FADD	Fas-Associated Death Domain
FASL	FAS Ligand
FIH	Factor Inhibiting HIF-1
FLICE = Caspase-8	FADD-Like IL-1 Converting Enzyme-like
FLIPL = CFLAR	Caspase-8 and FADD-like Apoptosis regulator
GM-CSF	Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor
HC	Hypoxie Chronique
HI	Hypoxie Intermittente
HIF	Hypoxia-Inducible Factor

ABREVIATIONS

HKG	House Keeping Gene
HRE	Hypoxia Response Element
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
iNOS=NOS2	inducible Nitric Oxide Synthase
IPAS	Inhibitory PAS domain protein
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kDa	kilo Dalton
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1 = CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein-1 = Chemokine (C-C motif) Ligand 2
MDSC	Myeloid -Derived Suppressor Cell
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MEK	MAP/ERK Kinase
MET	Mesenchymal to Epithelial Transition
MMP	Matrix MetalloProteinase
MPC	Myeloid Precursor Cell
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
N	Normoxie
NEM	N-EthylMaleimide
NF-IL6	Nuclear Factor for Interleukin 6
NF- κ B	Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NK	Natural Killer
NLS	Nuclear Localization Signal
NO	Nitric Oxide
ODD	Oxygen Dependent Degradation domain
p300	adenovirus E1A-associated 300-kDa protein
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGFB	Platelet-Derived Growth Factor B
PFA	ParaFormAldéhyde
PHD	Prolyl hydroxylase
PI3K	PhosphatidyInositol 3 Kinase
PKB = Akt	Protein Kinase B
PFK	PhosphoFructoKinase
PMSF	PhenylMethaneSulfonyl Fluoride
PNPP	ParaNitroPhenylPhosphate
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
pVHL	Von Hippel-Lindau protein
RT-qPCR	Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction
RIP	Receptor-Interacting Protein
RNS	Reactive Nitric Species
ROS	Reactive Oxygen Species

ABREVIATIONS

RPL13 = 23kDa	Ribosomal Protein L13 = Ribosomal highly basic 23-kDa
S6K	p70 S6 Kinase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspase
SODD	Silencer Of Death Domain
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1
SUMO	Small Ubiquitine-like MOdifier
TACE = ADAM17	TNF- α -Converting Enzyme
TAM	Tumor-Associated Macrophage
TAN	Tumor-Associated Neutrophil
TEMED	N,N,N',N'-TEtraMethylEthyleneDiamine
TGF β 1	Transforming Growth Factor β 1
TIF2 = SRC2	Transcriptional mediators/Intermediary Factor 2 = Steroid Receptor Coactivator 2
TIM	TRAF-Interacting Motif
TIMP1	Tissue Inhibitor MetalloProteinase 1
TNF = TNF- α	Tumor Necrosis Factor
tPA = PLAT	tissue Plasminogen Activator
TRADD	TNFR1-Associated Death Domain
TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
TRAIL = TNFSF10	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
uPA = PLAU	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell
WB	Western Blot

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	1
I. INTRODUCTION	2
1) Le système vasculaire sanguin	2
1.1. Mise en place du système vasculaire sanguin normal	2
1.2. La vascularisation tumorale	3
a) Les mécanismes angiogéniques	3
b) Structure et fonctionnalité du réseau sanguin tumoral	4
2) L'hypoxie	5
2.1. Définition et concept	5
2.2. Adaptation à l'hypoxie	6
2.3. Le facteur de transcription HIF	8
a) Structure de HIF-1	8
b) Les autres isoformes de HIF- α	8
c) Régulation de HIF-1 en normoxie versus hypoxie (chronique)	8
d) Activation non hypoxique de HIF – régulation de HIF-1 indépendante de l'oxygène	10
e) Gènes cibles de HIF-1	11
f) Régulation de HIF-1 α en hypoxie intermittente	11
3) Le microenvironnement tumoral	12
3.1. Origines du cancer : lien entre l'inflammation et le cancer	13
3.2. Les facteurs clés de l'inflammation liée au cancer	14
3.3. Composition cellulaire du microenvironnement tumoral	14
3.4. Polarisation des cellules immunitaires	15
a) Monocytes/Macrophages	15
b) Autres cellules immunes	15
3.5. Le réseau de chémokines	16
3.6. Inflammation et cancer : amis ou ennemis ?	17
4) TNF- α : tumor necrosis factor ou tumor promoting factor ?	18
4.1. Généralités	18
4.2. Signalisation intracellulaire du TNF- α à l'origine de ses deux rôles opposés	19
Objectifs	21

1) Culture cellulaire.....	22
2) Incubation en hypoxie et en présence de TNF- α	22
3) RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction)	22
3.1. Principe.....	22
3.2. Méthode.....	23
a) Extraction d'ARN avec le kit QIAGEN ou avec le système QIAcube.....	23
b) Rétro-transcription	24
c) PCR en temps réel	24
4) Dosage de la concentration en protéines.....	24
4.1. Par la méthode de Pierce avec ajout d'un réactif compatible avec l'usage de détergents	24
4.2. Par la méthode de Folin.....	25
5) Mesure de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF dans le milieu	25
5.1. Principe.....	25
5.2. Méthode.....	26
a) Préparation des échantillons pour mesurer la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8	26
b) Préparation des échantillons pour mesurer la sécrétion de bFGF.....	26
c) ELISA IL-6, IL-8 et bFGF	26
6) Extraction protéique.....	27
7) Western Blot	27
7.1. Principe.....	27
7.2. Méthode	27
a) Préparation des échantillons.....	27
b) Electrophorèse.....	27
c) Transfert des protéines sur une membrane.....	28
d) Traitement de la membrane et révélation.....	28
8) Marquage en immunofluorescence	28
8.1. Principe.....	28
8.2. Méthode.....	29
9) Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde mitotracker Red CMXRos.....	29
9.1. Principe de la sonde.....	29
9.2. Méthode.....	30

10) Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde lysotracker Red DND-99.....	30
10.1. Principe.....	30
10.2. Méthode.....	30
11) Mesure de l'activité des MMPs par zymographie	30
11.1. Principe.....	30
11.2. Méthode.....	31
a) Obtention des échantillons	31
b) Préparation des échantillons pour les petits zymogrammes (pas de normalisation)...	31
c) Préparation des échantillons pour les grands zymogrammes (avec normalisation)....	31
d) Préparation des petits et grands gels contenant de la gélatine	31
12) Identification des protéases observées sur le zymogramme	32
12.1. Utilisation d'inhibiteurs.....	32
12.2. Utilisation de la spectrométrie de masse	33
13) Test de migration des cellules (Scratch assay).....	33
14) Analyses statistiques	33

III. RESULTATS 34

Modèle d'étude.....	34
---------------------	----

1ERE PARTIE : ETUDE DES VARIATIONS D'EXPRESSION DE GENES IMPLIQUES DANS

L'INFLAMMATION ET/OU L' ANGIOGENESE	35
---	----

▪ ETUDE DES VARIATIONS D'EXPRESSION EN ARNm

1) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de cytokines.	36
---	----

2) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de facteurs de croissance	37
---	----

3) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de gènes impliqués dans le remodelage matriciel	37
---	----

4) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de eNOS et ICAM-1	38
---	----

▪ ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DE ICAM-1, IL-6, IL-8 ET BFGF

1) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression protéique de ICAM-1....	38
---	----

2) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-6	39
--	----

3) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-8	40
--	----

4) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion, l'abondance protéique et la localisation subcellulaire du bFGF.....	40
4.1. Mesure de la sécrétion de bFGF.....	40
4.2. Mesure de l'abondance protéique du bFGF	42
4.3. Localisation subcellulaire du bFGF	43
a) Localisation nucléaire	43
b) Localisation mitochondriale.....	43
2 ^{EME} PARTIE : ETUDE DES VARIATIONS D'ACTIVITE DE PROTEASES IMPLIQUEES DANS LE REMODELAGE MATRICIEL	45
1) Profil d'activité de protéases digérant la gélatine présentes dans le milieu des cellules endothéliales.....	45
2) Identification des protéases dont l'activité a été détectée par zymographie	46
3EME PARTIE : ETUDE FONCTIONNELLE DES EFFETS DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE ET DU TNF-A SUR LE COMPORTEMENT MIGRATOIRE DES CELLULES ENDOTHELIALES	50
 IV. DISCUSSION, PERSPECTIVES, CONCLUSION	 51
1) Discussion et perspectives	51
2) Conclusion générale.....	59
 V. BIBLIOGRAPHIE	 60
 VI. ANNEXES	 68

Le cancer a probablement toujours existé. Dès l'antiquité, sont apparues ses premières descriptions avec Hippocrate. L'histoire s'est ainsi écoulée jusqu'au vingtième siècle, lequel a vu se développer des centres de recherche sur le cancer. Les avènements des rayons X en 1895, de la radioactivité en 1896, de la chimiothérapie... ont bouleversé la connaissance du cancer et sa thérapeutique. Cependant, ce n'est que depuis 1950 que le progrès s'est réellement installé. Que de changements en un demi siècle dans la conception et la pratique de cette maladie ! Que de moyens nouveaux à notre disposition ! Quelle évolution ! Que de guérisons ! D'ailleurs, sur un ton humoristique comme le dit si bien Pierre Desproges : « S'il n'y avait pas la science, combien d'entre nous pourraient profiter de leur cancer pendant plus de cinq ans ? »¹. Et pourtant, les décès sont encore nombreux... !

Epidémiologiquement, l'incidence du cancer est proportionnelle à l'âge de l'individu. Aussi, elle varie avec le temps, le sexe et la zone géographique. Force est de constater que le risque de développer un cancer augmente alors que sa mortalité diminue. Or, cette maladie détient la seconde cause mondiale de décès (23,1%) après les pathologies cardio-vasculaires (27,2%) avec 12,4 millions de diagnostics et 7,6 millions de décès annuels (CIRC, Centre International de Recherche sur le Cancer, 2010). Tous cancers confondus, au cours de leur vie, une femme sur trois et un homme sur deux risquent de développer la maladie (NCI, National Cancer Institute, 2004) ! En Belgique, on dénombre environ 55 000 nouveaux cas par an et 27 000 décès (OEC, Observatoire Européen du Cancer, 2008).

Brièvement, le cancer résulte de l'accumulation de mutations chromosomiques au sein de cellules, mutations qui leur confèrent un potentiel de division anarchique et infini. Dès lors, une tumeur microscopique naît, profitant de l'oxygène et des nutriments apportés par le réseau sanguin de l'hôte. Mais, à un certain moment, sa taille est telle que les réseaux capillaires n'atteignent plus son centre, ce qui la soumet à une hypoxie qualifiée de chronique. Ainsi, sa seule chance de survie est de s'adapter à ce milieu hostile. Et c'est cette capacité qui fait sa force et sa résistance aux thérapies... Maligne, elle assure d'abord sa croissance par le détournement et le développement incontrôlé de son propre réseau sanguin. Peu fonctionnel, ce dernier amène un flux sanguin irrégulier, exposant les cellules tumorales et les cellules endothéliales à une hypoxie transitoire ou intermittente. En outre, une autre caractéristique essentielle de la tumeur est son microenvironnement inflammatoire, «complice» indissociable de la progression tumorale, dont le facteur principal est le TNF- α . Ce concept prend de plus en plus son essor dans le monde de la recherche fondamentale sur le cancer et représente un tournant incontournable dans la conception de nouvelles thérapies.

Pour une meilleure compréhension des résultats obtenus, nous introduirons une série de notions théoriques reprenant la mise en place et la structure des réseaux sanguins normaux et tumoraux, les concepts d'hypoxie chronique et d'hypoxie intermittente, et finalement les rôles du microenvironnement inflammatoire et du TNF- α vis-à-vis de la progression tumorale.

D'ores et déjà, chers lecteurs, c'est avec grand plaisir et grande passion que je vous adresse ce mémoire. De tout cœur, j'espère qu'il porte en lui quelque chose d'un cancer ravageur, et qu'une fois sa lecture entamée vous ne pourrez l'arrêter².

¹ Pierre Desproges, « Vivons heureux en attendant la mort »

² Phrase adaptée d'une citation de Pierre Bourgeade, «Warum»

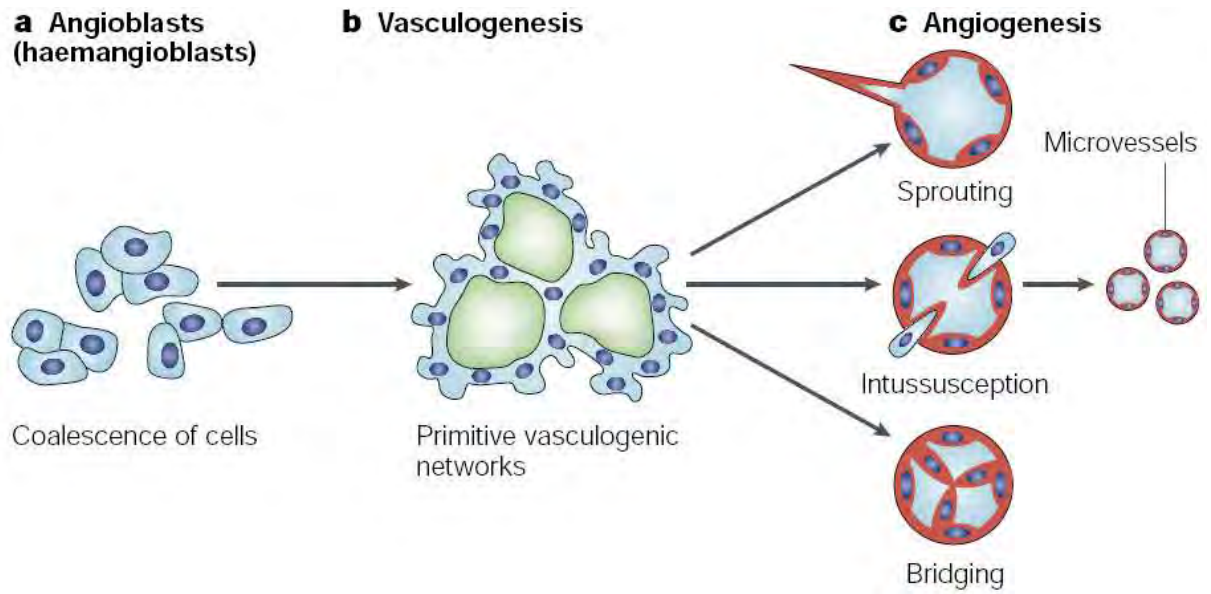


Figure I.1 : Système vasculaire sanguin : de la vasculogénèse à l'angiogénèse (Hendrix et al., 2003).

- a) Schéma montrant l'assemblage et la différenciation des précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes)
- b) Formation du réseau vasculaire primitif (vasculogénèse)
- c) Remodelage du réseau primitif par angiogénèse résultant en la formation de microvaisseaux

1) Le système vasculaire sanguin

1.1. Mise en place du système vasculaire sanguin normal

Les cellules mammaliennes ont besoin d'oxygène et de nutriments pour assurer leur survie. Elles doivent par conséquent se trouver à une distance inférieure à 100-200 µm des vaisseaux sanguins, ce qui représente la distance maximale de diffusion de l'oxygène. La vasculogénèse et l'angiogénèse sont donc indispensables pour la croissance des organismes multicellulaires (Carmeliet and Jain, 2000). Les microvaisseaux normaux sont organisés en une structure hautement ordonnée constitués de cellules endothéliales (CE), de péricytes et d'une membrane basale. Les péricytes sont impliqués dans la stabilisation vasculaire via l'établissement de contacts avec les CE le long des vaisseaux et via une signalisation paracrine. La membrane basale représente une couche fine et uniforme, enrichie en collagène de type IV couvrant la presque totalité de la longueur des CE. La couche la plus interne des vaisseaux est constituée d'une monocouche de CE, quiescentes dans la plupart des tissus pendant la vie d'un individu (Shojaei and Ferrara, 2008).

La vasculogénèse est le processus permettant la formation de vaisseaux sanguins *de novo* au cours du développement embryonnaire à partir de précurseurs indifférenciés, appelés angioblastes, ou à partir de précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse (EPCs), donnant lieu à un réseau primitif (Carmeliet, 2000; Carmeliet and Jain, 2000) (Figure I.1).

Historiquement, le terme angiogénèse était employé pour décrire la croissance des bourgeons endothéliaux à partir de veinules post-capillaires pré-existantes. De nos jours, ce mot est utilisé pour « dénoter » la croissance et le remodelage du réseau primitif en un réseau plus complexe à la fois au cours du développement mais aussi dans les tumeurs (Carmeliet, 2000) (Figure I.1). L'angiogénèse est un événement relativement rare chez l'adulte étant donné la quiescence des CE, excepté pendant le cycle ovulatoire ou la grossesse (Shojaei and Ferrara, 2008). Cet événement nécessite plusieurs étapes. D'abord, des facteurs pro-angiogéniques agissent sur les CE et augmentent leur perméabilité. Ensuite, les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) se détachent des vaisseaux pré-existants. Ce processus requiert la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC) par des enzymes protéolytiques. Ainsi, les MMPs, les inhibiteurs de MMPs (TIMPs), les élastases et les cathepsines jouent un rôle important dans ce remodelage matriciel. Les CE activées migrent alors dans l'espace périvasculaire où elles prolifèrent pour former des structures tubulaires. Une membrane basale et des péricytes enveloppent ensuite les CE afin de stabiliser les vaisseaux sanguins naissants (Furuya et al., 2005). Dans le cas d'une néo-vascularisation active, il est important de retenir que les CE activées réorganisent leur cytosquelette, expriment des molécules d'adhérence en surface telles que les intégrines et sélectines, et sécrètent des enzymes protéolytiques conduisant au remodelage de la MEC adjacente. Les facteurs angiogéniques autocrines et paracrines sont indispensables à l'induction de la migration des CE, leur prolifération, leur élongation, leur orientation et leur différenciation (Gupta and Qin, 2003). Les facteurs de croissance et cytokines majeurs autorisant l'angiogénèse incluent le VEGF, les FGF, les angiopoïétines (Ang), le TGF-β et le TNF-α. La surexpression du bFGF ou FGF-2 dans le contexte de l'angiogénèse est notamment connue pour augmenter l'activité angiogénique en induisant une chimotaxie et une migration des CE. Ce facteur de croissance a aussi été montré pour collaborer avec d'autres molécules angiogéniques et intégrer efficacement les activités des autres facteurs de façon synergique. En plus de ces molécules, de nombreux autres facteurs contrôlent le remodelage des vaisseaux. Par exemple, le PDGF-B exprimé par les CE intervient dans la stabilisation des

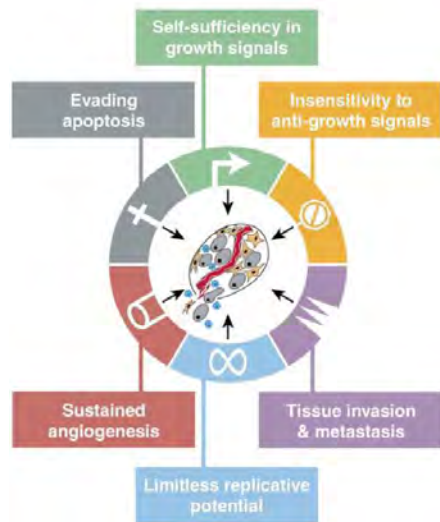


Figure I.2 : Représentation des six caractéristiques clés du cancer (Hanahan and Weinberg, 2000).

La plupart, voire tous les cancers, acquièrent le même set de capacités fonctionnelles pendant leur développement c'est-à-dire l'auto-suffisance pour les facteurs de croissance, l'échappement des cellules tumorales à l'apoptose, l'insensibilité aux signaux d'inhibition de la croissance, le maintien de l'angiogenèse, le potentiel réplcatif infini et l'invasion tissulaire et la métastase.

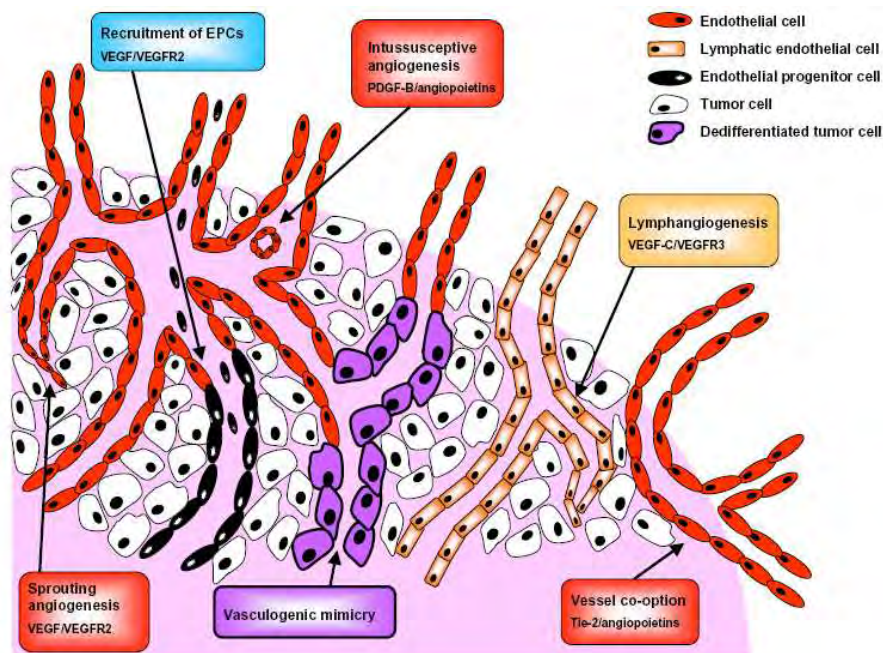


Figure I.3 : Représentation des principaux mécanismes de néovascularisation tumorale (Hillen and Griffioen, 2007).

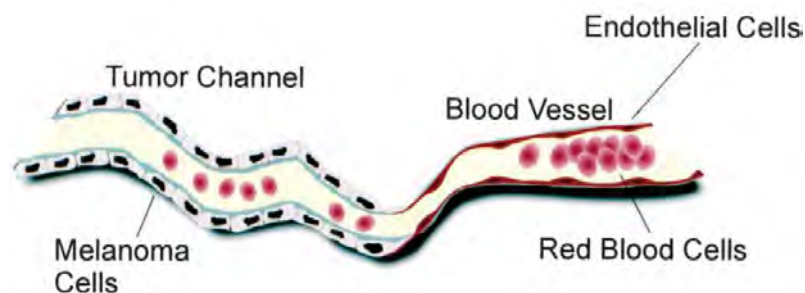


Figure I.4 : « Vasculogenic mimicry » (Folberg et al., 2000).

Les tumeurs agressives forment des canaux à partir de cellules tumorales qui se relient directement aux vaisseaux normaux des tumeurs. Ils sont délimités par des cellules tumorales extérieurement à la lame basale au contraire des vaisseaux sanguins normaux délimités intérieurement par des cellules endothéliales.

vaisseaux naissants en recrutant les péricytes. Par contre, l'angiostatine, l'endostatine, l'antithrombine III, l'IFN- β et LIF représentent d'importants inhibiteurs de l'angiogenèse en agissant par exemple via la suppression de la prolifération ou de la migration des CE (Furuya et al., 2005). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins dépend donc d'un équilibre entre ces molécules anti- et pro-angiogéniques. La balance entre ces deux types de molécules est dérégulée dans de nombreuses maladies ; le cancer en est l'exemple le plus marquant (Carmeliet and Jain, 2000).

1.2. La vascularisation tumorale

a) Les mécanismes angiogéniques

Pour la première fois, en 1971, J. Folkman proposa que la croissance tumorale et la formation de métastases soient dépendantes de l'angiogenèse et que son blocage pourrait être une stratégie d'arrêt de la croissance tumorale (Folkman, 1971). En effet, tout comme les cellules mammaliennes normales, les cellules cancéreuses ont besoin d'oxygène pour survivre. Les tumeurs peuvent donc atteindre une taille approximative de 1 à 2 mm³ au delà de laquelle leurs demandes métaboliques sont limitées par la diffusion de l'oxygène. Les tumeurs sont alors contraintes de s'orienter vers un phénotype angiogénique activant les vaisseaux sanguins du stroma voisin afin d'initier la formation de nouveaux vaisseaux pour l'irriguer (Hillen and Griffioen, 2007). Cette annonce fut alors le point de départ d'une recherche intensive sur des molécules pro- et anti-angiogéniques intervenant dans la structure et fonctionnalité du réseau sanguin tumoral. En effet, sans vaisseaux sanguins, une tumeur ne peut se développer ni être à l'origine de métastases (Carmeliet and Jain, 2000).

Plus récemment, Hanahan et Weinberg décrivent le maintien de l'angiogenèse comme une des six caractéristiques du phénotype cancéreux et l'expliquèrent comme un événement acquis au cours du développement tumoral via un switch angiogénique (Figure I.2). Ce switch est provoqué par un déséquilibre de la balance entre les inducteurs et les inhibiteurs potentiellement causé par un changement de l'expression génique des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces dernières peuvent alors surexprimer des régulateurs positifs de l'angiogenèse (Gupta and Qin, 2003).

Cette angiogenèse consiste en un bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires pré-existants aboutissant à la formation de la vascularisation tumorale. Ce processus nécessite plusieurs étapes débutant par l'activation des CE via la liaison, à leur récepteur, de facteurs de croissance spécifiques. De là, la MEC et la membrane basale sont dégradées localement par des protéases activées permettant ainsi la migration des CE et leur prolifération. Grâce à la polarisation des CE, une lumière est créée et un vaisseau sanguin immature est formé. Le recrutement de cellules murales et la génération de MEC stabilisent ensuite les vaisseaux sanguins nouvellement formés (Hillen and Griffioen, 2007). Cependant, en plus du bourgeonnement vasculaire, plusieurs autres mécanismes de néovascularisation ont été identifiés dans les tumeurs, incluant l'intussusception, le recrutement d'EPCs, la cooptation vasculaire et le phénomène de « vasculogenic mimicry » (Hillen and Griffioen, 2007) (Figure I.3). Ceux-ci sont brièvement décrits ci-dessous.

L'intussusception se caractérise par la séparation de vaisseaux pré-existants en deux nouveaux vaisseaux par la formation d'une travée tissulaire transvasculaire dans la lumière de ceux-ci. Ce mécanisme, rapide, peut se mettre en place en quelques heures, voire même quelques minutes car il ne nécessite pas la prolifération des CE. La première étape consiste en la

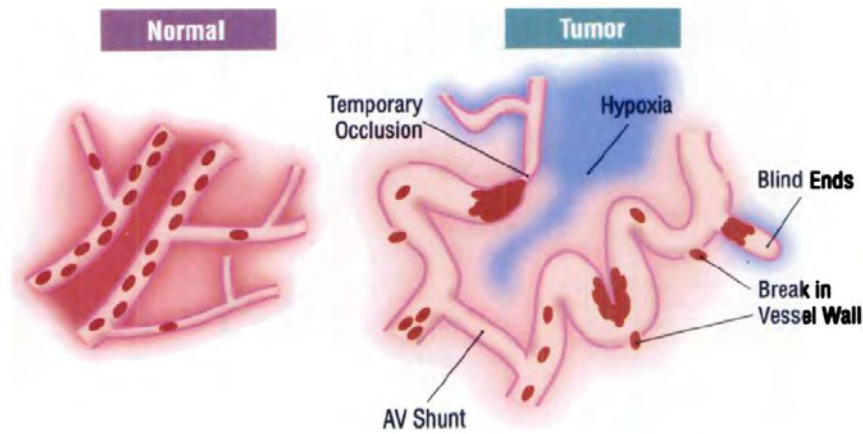


Figure I.5 : Représentation des différences principales entre un réseau sanguin normal et un réseau sanguin tumoral à l'origine de l'hypoxie intermittente (Brown and Giaccia, 1998).

Les vaisseaux sanguins normaux sont bien organisés et suffisamment proches les uns des autres pour oxygéner l'ensemble du tissu. Au contraire, les vaisseaux sanguins tumoraux sont dilatés, tortueux, présentant des culs de sac et des trous dans leurs parois. Ce réseau tumoral cause un flux sanguin irrégulier conduisant à l'apparition de régions d'hypoxie transitoire touchant aussi bien les cellules tumorales que les cellules endothéliales.

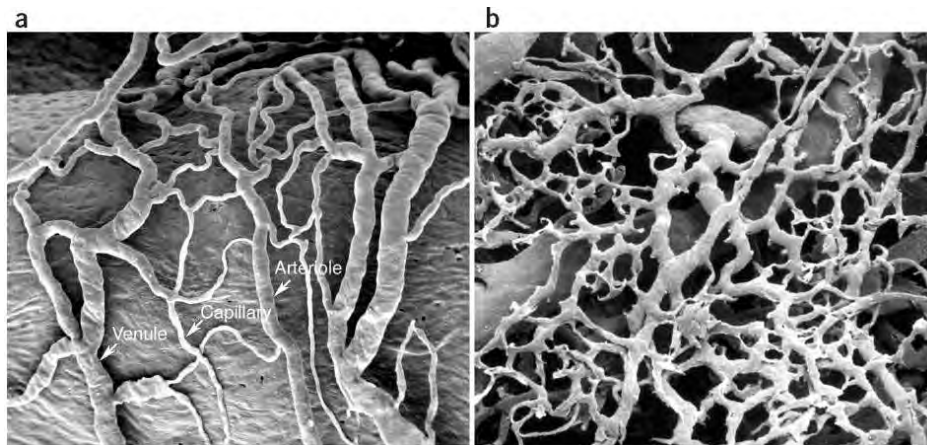


Figure I.6 : Images en microscopie électronique à balayage après moulage de vaisseaux sanguins normaux ou tumoraux (McDonald and Choyke, 2003).

- a) Microvasculatisation normale montrant un arrangement organisé en artérioles, capillaires et vénules au niveau du vasa vasorum du sinus carotidien chez le rat
- b) Microvasculatisation tumorale montrant une désorganisation et un manque de hiérarchie conventionnelle des vaisseaux sanguins ; les artérioles, capillaires et vénules ne sont pas identifiables en tant que tel

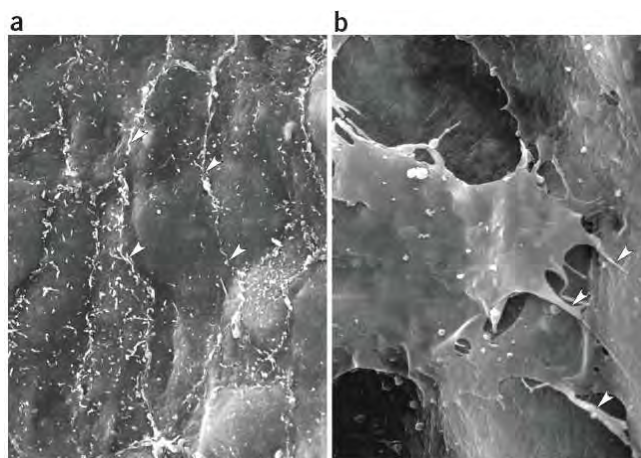


Figure I.7 : Images en microscopie électronique à balayage comparant la surface luminale des vaisseaux sanguins normaux et tumoraux (McDonald and Choyke, 2003).

- a) Surface luminale de vaisseaux sanguins normaux lisse avec de nombreuses jonctions endothéliales serrées
- b) Surface luminale de vaisseaux sanguins tumoraux montrant des espaces intercellulaires, des chevauchements de cellules endothéliales et d'autres anomalies

formation d'un pont transluminal grâce à un contact entre des CE opposées. Ensuite, une réorganisation des jonctions interendothéliales et une perforation de la bicouche se produisent. Un pilier interstitiel est créé et des péricytes et myofibroblastes viennent envahir et couvrir la travée nouvellement formée. Enfin, les CE se rétractent, le diamètre des vaisseaux s'agrandit et deux nouveaux vaisseaux sont ainsi formés (Hillen and Griffioen, 2007).

Jusqu'en 1997, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins chez les adultes était considérée comme ayant lieu exclusivement par les mécanismes de bourgeonnement et d'intussusception. Ce paradigme fut controversé suite à la découverte d'EPCs et il est actuellement bien démontré que les nouveaux vaisseaux peuvent grandir à partir du recrutement d'EPCs circulant dans le sang (Hillen and Griffioen, 2007). Ainsi, les EPCs se décrochant de la paroi des vaisseaux ou provenant de la moelle osseuse contribuent à l'angiogenèse tumorale (Carmeliet and Jain, 2000). Leur mobilisation et leur recrutement sont favorisés par divers facteurs de croissance comme le VEGF, des chémokines comme l'IL-8, CXCL-1 et CXCL-2, et des cytokines produits par les cellules tumorales. Ce phénomène requiert différentes étapes ; la chémoattraction, l'arrêt actif des EPCs et leur migration dans l'espace interstitiel nécessitant les P-, E-sélectines et les intégrines, l'incorporation dans le réseau vasculaire, et la différenciation en CE matures (Hillen and Griffioen, 2007).

Généralement, les tumeurs commencent à croître en une masse non vascularisée dans laquelle le développement de nouveaux vaisseaux ne se fera qu'une fois les ressources limitées. Mais, au sein de tissus hautement vascularisés, les cellules tumorales peuvent grandir le long de vaisseaux pré-existants de façon à les placer au centre de la masse tumorale. Ce processus est appelé cooptation vasculaire et n'entraîne pas, dans un premier temps, de réponse angiogénique (Hillen and Griffioen, 2007).

C'est ensuite en 1999 que le terme de « vasculogenic mimicry » fut introduit. Ce type d'angiogenèse a lieu principalement dans des tumeurs agressives où les cellules tumorales elles-mêmes peuvent imiter les CE pour former des pseudo-vasseaux sanguins (Maniotis et al., 1999). Ce réseau vasculaire alternatif est composé de cellules tumorales exprimant des marqueurs de CE mais le mécanisme exact par lequel ce réseau se met en place doit encore être élucidé (Folberg et al., 2000; Hendrix et al., 2003) (Figure I.4).

b) Structure et fonctionnalité du réseau sanguin tumoral

Les vaisseaux tumoraux présentent des anomalies structurelles et fonctionnelles. Le réseau vasculaire au sein de la tumeur est largement désorganisé avec des vaisseaux tortueux, dilatés, présentant un diamètre inconstant, des branchements excessifs et de nombreux culs de sac (Brown and Giaccia, 1998; Carmeliet and Jain, 2000) (Figure I.5). Des images obtenues en microscopie électronique à balayage montrent la perte de la hiérarchie conventionnelle au sein de la vascularisation tumorale où artérioles, capillaires et veinules ne sont plus identifiables (Figure I.6). De plus, la surface luminale d'un vaisseau normal est lisse avec des jonctions serrées apparentes alors que celle d'un vaisseau tumoral montre des espaces intercellulaires, des chevauchements de cellules endothéliales et bien d'autres anomalies (McDonald and Choyke, 2003) (Figure I.7). Outre leur structure désordonnée, les vaisseaux tumoraux présentent une paroi perméable avec une membrane basale discontinue voire même absente (Carmeliet and Jain, 2000). Comme expliqué auparavant, cette désorganisation est due à un déséquilibre des régulateurs angiogéniques comme le VEGF et les angiopoïétines. Sa principale conséquence résulte en un flux sanguin chaotique et variable conduisant à des régions hypoxiques au sein de la tumeur ainsi qu'au sein de l'endothélium tumoral (Carmeliet and Jain, 2000).

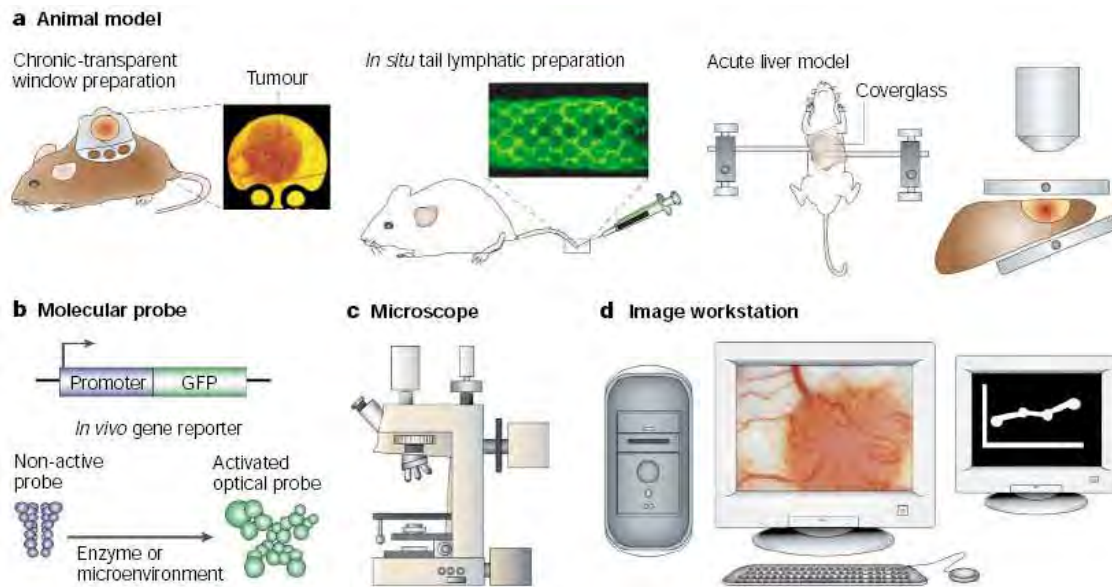


Figure I.8 : Les quatre composants requis pour la microscopie intravitale (Jain et al., 2002).

- La préparation d'un tissu permettant sa visualisation. Trois modèles sont montrés : une fenêtre transparente dans laquelle grandit une tumeur sur la surface interne de la peau ; une préparation *in situ* pour laquelle un traceur optique est injecté dans l'espace interstitiel de la queue ; une préparation chirurgicale de l'animal pour révéler une tumeur dans un organe interne.
- Une sonde moléculaire pouvant être détectée. Deux exemples sont montrés : la GFP (green fluorescent protein) exprimée dans les cellules/animaux génétiquement modifiés et sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt ; une sonde optique activée par une enzyme spécifique ou par un certain microenvironnement.
- Un microscope équipé d'une source d'excitation et d'un système de détection qui transfère les images à un ordinateur d'acquisition et à une station d'analyse des données.
- Un système de traitement et d'analyse d'images utilisé pour en extraire des données quantitatives.

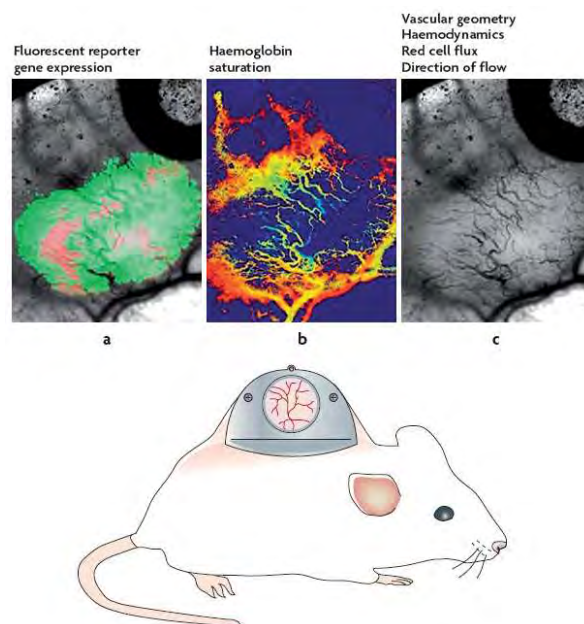


Figure I.9 : Représentation des études qui peuvent être faites par microscopie intravitale avec l'implantation d'une fenêtre transparente permettant la visualisation de la croissance d'une tumeur (Dewhirst et al., 2008).

- Deux gènes rapporteurs utilisés simultanément sont montrés. Celui émettant une fluorescence rouge permet l'identification de toutes les cellules tumorales tandis que celui émettant une fluorescence verte permet de visualiser l'activité de HIF-1 (HRE-GFP). Ceci permet l'identification des cellules tumorales dans lesquelles HIF-1 est transcriptionnellement actif.
- La saturation en oxygène de l'hémoglobine des microvaisseaux est visualisée. La couleur orange à rouge représente 70-90% de saturation tandis que la couleur bleue claire représente 10-30% de saturation.
- Cette image montre la disposition des microvaisseaux en utilisant la transillumination.

En plus de la microscopie électronique à balayage montrant les anomalies structurales du réseau sanguin tumoral, d'autres techniques comme la microscopie intravitale mettent en avant ses anomalies fonctionnelles. La microscopie intravitale est basée sur la préparation d'un tissu autorisant sa visualisation ; par exemple, l'implantation de tumeurs dans une chambre transparente au niveau de la peau. La microscopie intravitale couplée à la microscopie à fluorescence ou à laser multiphoton permet de mesurer le flux sanguin, la vitesse des globules rouges, la densité vasculaire, la perméabilité endothéliale, les interactions cellules endothéliales – leucocytes, les pressions intravasculaires et interstitielles, etc. En effet, cette technique permet un contrôle continu et non-invasif des processus moléculaires et cellulaires dans un tissu vivant avec une haute résolution allant jusqu'à 1-10 μm . Elle nécessite l'utilisation d'un modèle animal, d'un gène rapporteur souvent fluorescent, d'un microscope couplé à un appareil photo, d'un système d'acquisition d'images et d'un ordinateur analysant les données et extrayant les paramètres intéressants (Figures I.8 et I.9). Les images fonctionnelles obtenues par cette technique ont révélé un flux sanguin et une perméabilité vasculaire spatio-temporellement hétérogène dans les tumeurs. Une autre application de la microscopie intravitale consiste en l'utilisation de sondes répondant de manière optique aux changements de pH ou de pression en oxygène (pO_2) pour cartographier le microenvironnement métabolique des tumeurs (Jain et al., 2002). En l'occurrence, une étude a mesuré des changements dans le pH tissulaire et la pO_2 mettant en évidence la variabilité du flux sanguin dans les tumeurs pouvant transitoirement s'arrêter ou changer de direction. Dès lors, le flux sanguin faible mène à une hypoxie tissulaire même en présence d'une angiogenèse abondante (Helmlinger et al., 1997). Plusieurs observations comme celle-là ont engendré le développement du concept d'hypoxie transitoire retrouvée dans la plupart des tumeurs. Ce type d'hypoxie est expliqué ci-après.

2) L'hypoxie

2.1. Définition et concept

L'hypoxie, définie comme la diminution du niveau d'oxygène au sein d'un tissu, est une des caractéristiques fondamentales du micro-environnement tumoral. L'hypoxie chronique (HC) et l'hypoxie intermittente (HI) constituent les deux types d'hypoxie retrouvés dans les tumeurs. L'hypoxie chronique est la première à survenir et résulte de la limitation de la diffusion de l'oxygène (Toffoli and Michiels, 2008). En effet, le système vasculaire tumoral apporte oxygène et nutriments aux cellules mais au fur et à mesure de la croissance tumorale, certaines cellules deviennent de plus en plus éloignées des vaisseaux sanguins ; ceci est dû à une densité du réseau vasculaire trop faible pour l'irrigation de l'entière de la tumeur. Ces cellules se retrouvent donc dans un environnement hypoxique où la tension en oxygène devient proche de zéro (Michiels, 2004; Toffoli and Michiels, 2008) (Figure I.10). Plus récemment décrite, l'hypoxie intermittente, aussi appelée cyclique ou transitoire, provient de la désorganisation du réseau sanguin tumoral à l'origine d'un flux sanguin irrégulier (comme expliqué dans le point précédent) (Bennewith and Durand, 2004; Chaplin and Hill, 1995; Kimura et al., 1996; Pigott et al., 1996). Ces limitations transitoires de la perfusion surviennent également suite à la compression mécanique des parois des microvaisseaux causée par la prolifération des cellules tumorales, ou suite à l'obstruction des vaisseaux par des globules blancs circulants (Rofstad et al.). Ce type d'hypoxie affecte les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux. La périodicité des changements de ce flux sanguin varie d'une tumeur à l'autre ainsi qu'au sein d'une même tumeur ; ceci dépendant de la complexité architecturale et de la maturation du réseau (Toffoli

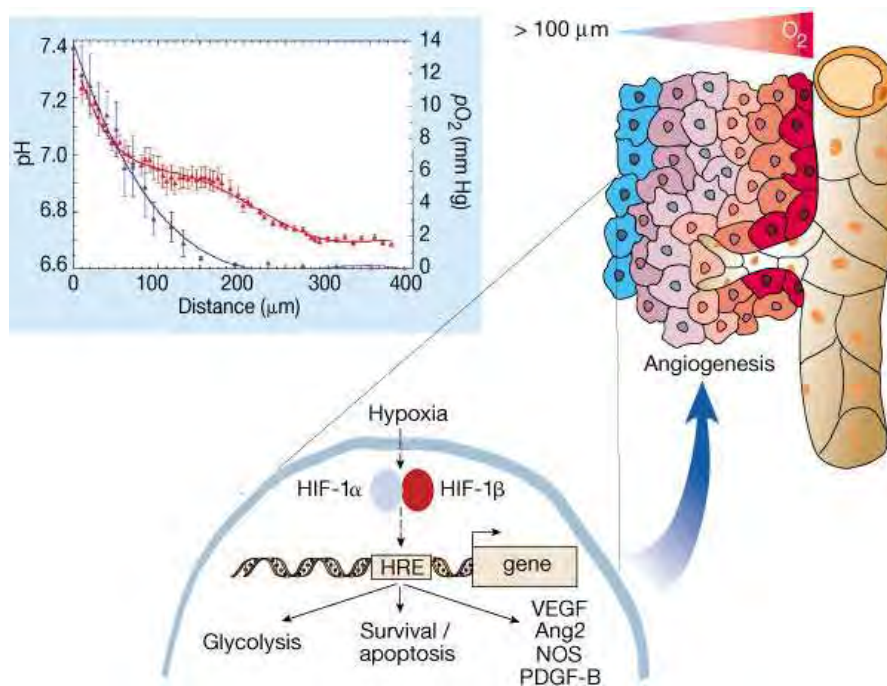


Figure I.10 : Hypoxie tumorale (Carmeliet and Jain, 2000).

Certaines cellules tumorales sont localisées à une distance supérieure à 100 μm , distance représentant la limite de diffusion de l'oxygène des vaisseaux sanguins. Elles deviennent alors hypoxiques. Ainsi, le facteur de transcription HIF augmente la transcription de plusieurs gènes angiogéniques régulant la glycolyse et la survie cellulaire. Le graphique montre la relation entre la distance des cellules tumorales des vaisseaux sanguins les plus proches et le degré d'hypoxie (bleu) ou d'acidose (rouge).

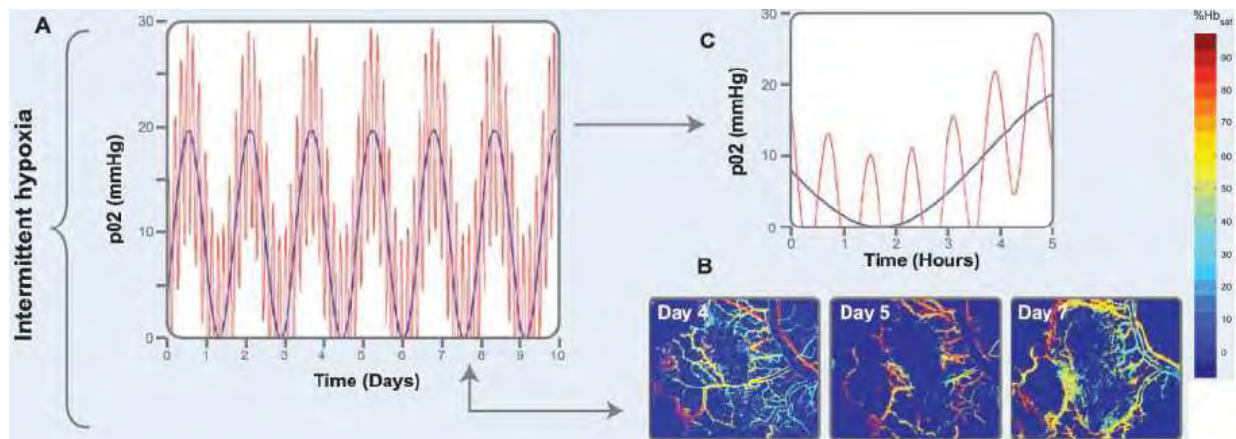


Figure I.11 : Représentation des fluctuations temporelles de la $p\text{O}_2$ tissulaire se déroulant selon deux échelles de temps se chevauchant (Dewhirst, 2007).

- Les fluctuations au cours des jours résultent de l'angiogenèse et du remodelage vasculaire.
- Les fluctuations de la saturation en hémoglobine d'une tumeur sont observées à l'aide d'une chambre transparente au cours de jours successifs illustrant la fluctuation journalière de la libération d'oxygène au sein de la tumeur. Les changements de la vascularisation au jour 5 permettent une meilleure oxygénation de la tumeur comparé aux jours 4 et 7.
- Les fluctuations au cours des heures résultent de l'instabilité du flux sanguin dans le réseau vasculaire tumoral. Ces fluctuations sont influencées par l'état général d'oxygénation du tissu (ligne bleue).

and Michiels, 2008). Néanmoins, ce type d'hypoxie montre des patterns clairs de périodicité (Dewhirst et al., 2008). Ces irrégularités ont été montrées par plusieurs techniques comme l'implantation de microsondes dans les tumeurs, l'imagerie par résonance magnétique, par microscopie électronique à balayage et par microscopie intravitale (voir point 1.2 b) et, l'utilisation de marqueurs de l'hypoxie tels que les 2-nitroimidazoles réduits par les nitroréductases en présence d'une pression en oxygène faible. Ces techniques permettent une meilleure compréhension de changements spatio-temporels de l'hypoxie dans les tumeurs solides. Sur base des résultats de nombreuses études qualifiant l'instabilité du flux sanguin comme ubiquitaire dans plusieurs lignées tumorales ainsi que dans des tumeurs humaines *in vivo* (Bennewith and Durand, 2004; Chaplin and Hill, 1995; Kimura et al., 1996; Pigott et al., 1996), Dewhirst a répertorié deux échelles de temps pour ces variations. Ainsi, les fluctuations temporelles de la pO_2 tissulaire à l'origine de l'hypoxie intermittente se déroulent majoritairement selon deux échelles de temps qui se chevauchent : des fluctuations allant de un à trois cycles par heure et des fluctuations de jour en jour (Figure I.11). Les fluctuations de jour en jour résultent de l'angiogenèse et du remodelage de la vascularisation tumorale touchant donc essentiellement les cellules tumorales alors que les fluctuations au cours des heures sont issues de l'instabilité du flux sanguin causée par l'architecture non fonctionnelle du réseau tumoral touchant les cellules cancéreuses et endothéliales (Dewhirst, 2007).

Les cellules tumorales et les cellules endothéliales perçoivent la diminution du niveau d'oxygène comme toutes les cellules de l'organisme, et elles sont capables de s'y adapter (Michiels, 2004). Elles le font tellement bien que l'hypoxie (chronique ou intermittente) est décrite pour protéger les cellules tumorales de l'apoptose induite par la radiothérapie et la chimiothérapie (Toffoli and Michiels, 2008). Il a été observé *in vitro* que les cellules endothéliales, comme les cellules tumorales, deviennent radiorésistantes suite à un préconditionnement par une hypoxie intermittente, avec une augmentation de leur survie après une irradiation (2 Gy). Par contre, une incubation en hypoxie chronique avant une irradiation ne protège pas les cellules endothéliales de l'apoptose (Martinive et al., 2006). Moeller et al. ont aussi montré, *in vivo* cette fois, un effet radioprotecteur de l'hypoxie intermittente au niveau des cellules endothéliales après irradiation. Ils suggèrent que cette protection pourrait venir de la sécrétion de cytokines radioprotectrices par les cellules tumorales après la réoxygénation. Le milieu conditionné de cellules tumorales incubées en hypoxie suivie de réoxygénation est plus radioprotecteur que celui venant de cellules tumorales incubées en normoxie, normoxie avec irradiations ou hypoxie sans réoxygénation. Ils ont en plus montré que cette radioprotection est dépendante de HIF-1 car aucun effet de protection des cellules endothéliales incubées avec du milieu de cellules tumorales incompetentes pour HIF-1 n'a été observé (Moeller et al., 2004). Finalement, Cairns et al. ont suggéré que l'hypoxie intermittente rendait les tumeurs plus invasives. En effet, ils ont observé une augmentation très significative du nombre de micrométastases du poumon chez des souris ayant une tumeur exposée à 12 cycles par jour de 10 minutes d'hypoxie suivies de 10 minutes de réoxygénation par rapport aux souris contrôle tandis que l'hypoxie chronique n'augmente pas le nombre de métastases (Cairns et al., 2001). La réduction de la distribution des agents thérapeutiques aux cellules hypoxiques, leur radiorésistance intrinsèque, leur résistance à l'apoptose et la capacité d'invasion augmentée des cellules tumorales font donc de l'hypoxie un mauvais facteur pronostique de l'issue d'un traitement (Michiels, 2004).

2.2. Adaptation à l'hypoxie

Dès que l'apport en oxygène est limité, la production d'ATP par la phosphorylation oxydative est réduite. La phosphorylation oxydative se caractérise par la création d'un gradient de

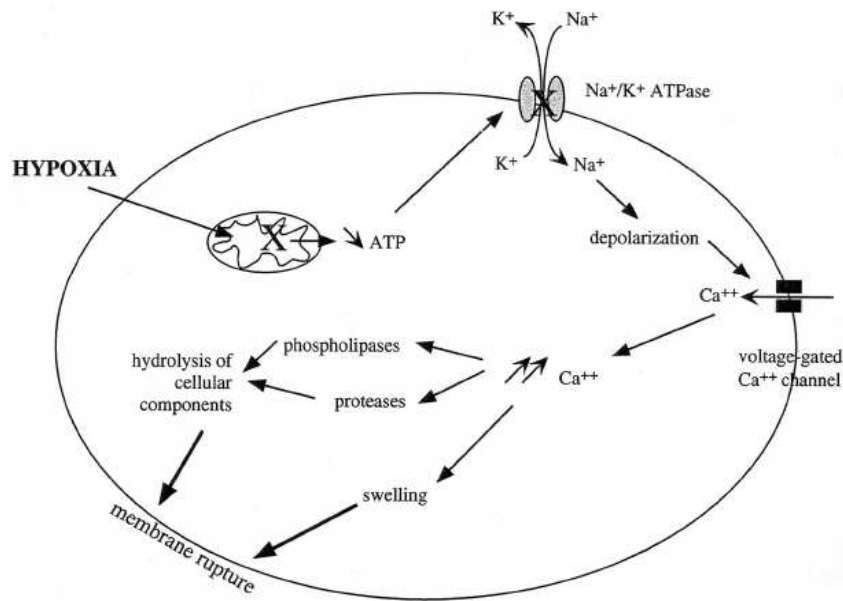


Figure I.12 : Représentation de la cascade menant à la mort cellulaire lorsque les cellules sont exposées à une hypoxie sévère (Michiels, 2004).

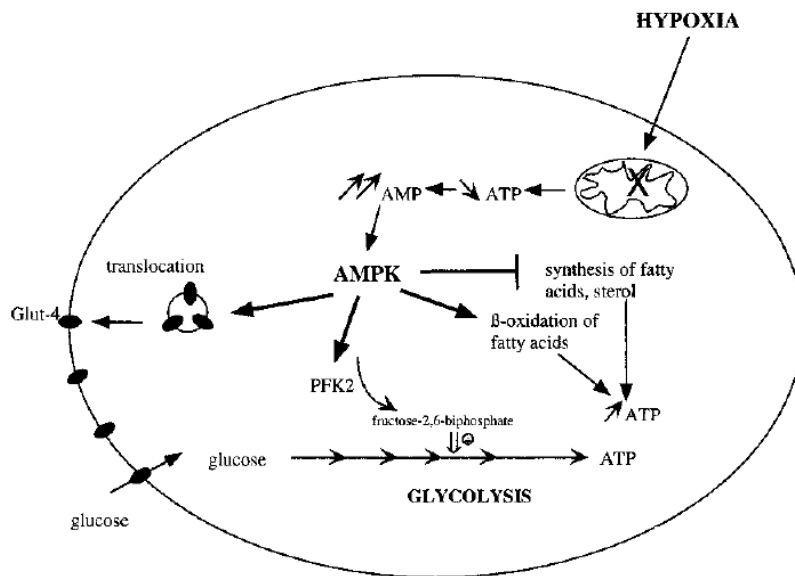


Figure I.13 : Représentation des réponses adaptatives à l'hypoxie avec le rôle principal de l'AMPK régulant l'équilibre entre les voies cataboliques et anaboliques (Michiels, 2004).

protons au niveau de la membrane interne mitochondriale résultant d'un transport d'électrons de complexes en complexes avec l'O₂ comme accepteur final. Le potentiel électrochimique de ce gradient permet la synthèse d'ATP grâce à l'ATP synthase. La diminution de l'apport en oxygène, nécessaire à la production d'ATP suivant ce processus, peut conduire à la mort cellulaire. En effet, le maintien de l'équilibre homéostatique intracellulaire nécessite beaucoup d'ATP pour le fonctionnement des pompes qui en sont dépendantes telles que la Na⁺/K⁺ ATPase. Le contenu élevé en ATP d'une cellule représente donc un paramètre fondamental à sa survie. Si le niveau en ATP diminue, les pompes ioniques ne fonctionnent plus efficacement, ce qui engendre une dépolarisation membranaire. Cette dernière conduit à un influx incontrôlé de calcium au travers des canaux calciques dépendant du voltage. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium induit un gonflement cellulaire et active phospholipases et protéases menant à l'hydrolyse de composants cellulaires, phénomène aboutissant à la nécrose de la cellule (Figure I.12). Pour s'adapter à l'hypoxie, des mécanismes cellulaires et moléculaires sont déclenchés (Michiels, 2004).

Au niveau cellulaire, l'adaptation à l'hypoxie s'accomplit par l'activation des voies produisant de l'énergie telles que la glycolyse ou la β -oxydation des acides gras, et par l'inhibition des processus la consommant comme la synthèse de protéines, d'ADN ou d'ARN. L'inhibition de la synthèse se fait au profit du maintien de l'activité des pompes Na⁺/K⁺ et de la régulation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ (Michiels, 2004). Cette redirection de l'utilisation de l'énergie implique des mécanismes de régulation dont notamment l'inhibition de l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe causée par l'inhibition de la kinase mTOR et par l'activation de la voie UPR (unfolded protein response) (Wouters and Koritzinsky, 2008). En plus de la hiérarchisation de la consommation énergétique, une activation allostérique de la glycolyse garantit la demande énergétique minimale de la cellule. Ce balancement d'un métabolisme aérobie assuré par la respiration mitochondriale à un métabolisme anaérobie géré par la glycolyse est appelé « effet Pasteur ». Malgré un rendement en ATP plus faible que celui de la phosphorylation oxydative, la glycolyse, en présence d'une quantité suffisante de glucose, est capable de maintenir la production d'ATP, et ce, grâce à l'augmentation de l'activité des enzymes glycolytiques. Cette activation se manifeste en quelques minutes par la régulation allostérique positive de la phosphofructokinase (PFK) (via l'ADP, l'AMP, le fructose-2,6-biphosphate). Le fructose-2,6-biphosphate, activateur allostérique majeur de la PFK, est synthétisé par la PFK-2. Cette dernière enzyme est régulée par phosphorylation via l'AMP kinase (AMPK) dans un premier temps, mais son expression est aussi augmentée transcriptionnellement via HIF-1. L'AMPK constitue le senseur principal de la charge énergétique cellulaire par le biais de l'AMP et l'ADP l'activant et l'ATP l'inhibant. Ainsi en régulant l'activité d'autres enzymes, l'AMPK active les voies cataboliques et éteint les voies anaboliques, stimule la translocation de Glut-4, un transporteur de glucose, en membrane plasmique et augmente ainsi l'incorporation du glucose (Figure I.13). La plupart de ces mécanismes sont activés directement en réponse à l'hypoxie via l'activation de protéines déjà présentes. Leur induction continue ensuite à plus long terme grâce à la surexpression de gènes encodant des facteurs clés de ces réponses. Cette adaptation au niveau moléculaire est alors orchestrée par une réponse transcriptionnelle principalement médiée par les facteurs HIF (hypoxia-inducible factor) (Michiels, 2004). Néanmoins, en plus de la famille des facteurs HIF, l'hypoxie active beaucoup d'autres facteurs de transcription comme NF- κ B, CREB, AP-1, p53, c-Myc, Egr-1 et NF-IL6 (Kenneth and Rocha, 2008; Nanduri et al., 2008).

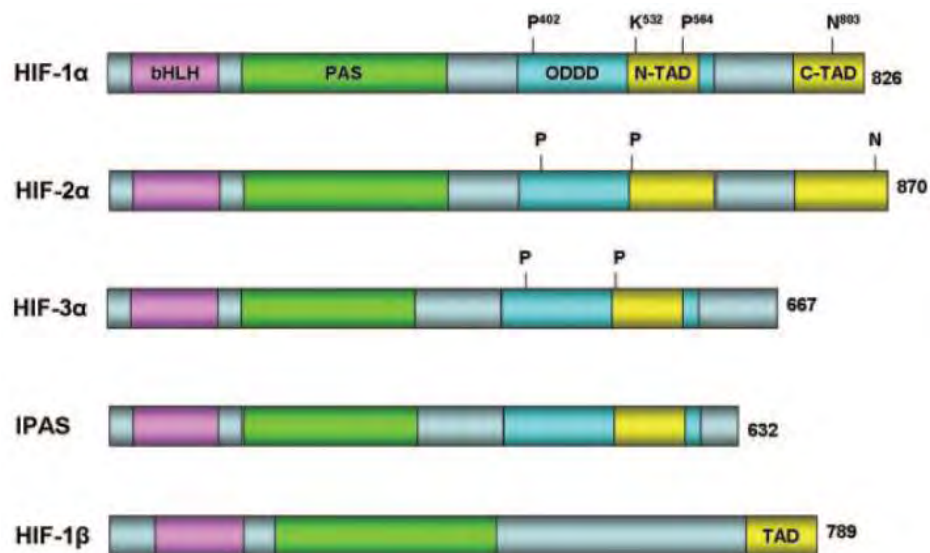


Figure I.14 : Structure des sous-unités HIF- α et de la sous-unité HIF-1 β (Ke and Costa, 2006).

HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , IPAS) et HIF-1 β appartiennent à la famille des protéines bHLH et PAS. HIF- α contient un domaine ODD (oxygen dependent degradation) médiant sa stabilité dépendante de l'oxygène via l'hydroxylation de deux résidus proline (P) et l'acétylation d'un résidu lysine (K). Les résidus proline sont conservés chez HIF-2 α et HIF-3 α . HIF-1 α et HIF-2 α contiennent deux domaines de transactivation (C-TAD et N-TAD) et HIF-1 β n'en contient qu'un. Le nombre total d'acides aminés de chaque sous-unité est noté à la fin de leur structure.

2.3. Le facteur de transcription HIF

Le facteur de transcription HIF-1 (ou -2) est un régulateur clé responsable de l'induction de gènes facilitant l'adaptation et la survie des cellules en condition d'hypoxie (Ke and Costa, 2006). En effet, ce facteur a été découvert au début des années 1990 dans le laboratoire de Semenza suite à l'identification d'une séquence HRE (hypoxia response element) dans le gène de l'érythropoïétine, une hormone stimulant la production des érythrocytes et dont la transcription est induite par l'hypoxie (Ke and Costa, 2006; Kenneth and Rocha, 2008; Semenza and Wang, 1992).

a) Structure de HIF-1

HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité HIF-1 α (120 kDa) et d'une sous-unité HIF-1 β (94 kDa), aussi appelée ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Michiels, 2004; Toffoli and Michiels, 2008). Ces deux sous-unités appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH (basic helix-loop-helix) - PAS (acronyme référant aux premières protéines, Per-ARNT-Sim, dans lesquelles ce motif a été identifié) (Ke and Costa, 2006; Otrock et al., 2009). Les motifs HLH et PAS sont requis pour la dimérisation des sous-unités tandis que la partie basique du motif bHLH permet la liaison des sous-unités à la séquence d'ADN HRE. HIF-1 α contient deux domaines de transactivation du côté C-terminal (C-TAD) et N-terminal (N-TAD). Des co-activateurs comme CBP/p300 interagissent avec le C-TAD, ce qui est nécessaire à l'activation de la transcription génique induite par HIF-1 (Ke and Costa, 2006).

b) Les autres isoformes de HIF- α (Figure I.14)

Peu de temps après la découverte de HIF-1 α , HIF-2 α a été identifié. HIF-2 α partage 48% d'identité avec la séquence en acides aminés de HIF-1 α ainsi que de nombreuses similarités structurales et biochimiques telles que sa dimérisation avec HIF-1 β (donnant HIF-2) et sa liaison sur la séquence HRE. Au contraire de HIF-1 α ayant une expression ubiquitaire, HIF-2 α est majoritairement exprimé au niveau des poumons, de l'endothélium et des corps carotidiens (Ke and Costa, 2006). La sous-unité HIF-3 α a, elle, été découverte plus tard que les deux autres isoformes. Elle est exprimée dans un grand nombre de tissus, dimérise avec HIF-1 β et se lie à la séquence HRE. Plusieurs variants venant de l'épissage alternatif de HIF-3 α existent dont IPAS (inhibitory PAS domain protein) qui est exprimé essentiellement dans les cellules de Purkinje du cerebellum et de l'épithélium cornéen. IPAS ne possède pas d'activité de transactivation endogène mais il interagit avec HIF-1 α ou HIF-2 α empêchant alors sa liaison à l'ADN et agissant ainsi comme un régulateur négatif de l'activité de HIF-1 et HIF-2. HIF-1 α et HIF-2 α font davantage l'objet d'études par rapport à HIF-3 α (Ke and Costa, 2006; Kenneth and Rocha, 2008).

c) Régulation de HIF-1 en normoxie versus hypoxie (chronique)

HIF-1 β est constitutivement exprimé, localisé dans le noyau, et ses niveaux d'ARNm et de protéines sont stables indépendamment de la disponibilité de l'oxygène. HIF-1 α est, quant à lui, hautement régulé par l'oxygène (avec $t_{1/2} \sim 5$ min) (Ke and Costa, 2006). La transcription et la synthèse de HIF-1 α sont constitutives et non affectées par l'oxygène au contraire de sa stabilité et de sa localisation subcellulaire (Ke and Costa, 2006; Lee et al., 2004). Ainsi, malgré la diminution générale de la synthèse protéique en hypoxie empêchant l'initiation de la traduction dépendante de la coiffe, les protéines HIF-1 α et ARNT sont efficacement traduites grâce à la présence d'IRES, sites d'entrée interne pour les ribosomes, dans leur ARNm (Michiels, 2004; Richter and Sonenberg, 2005). En normoxie, HIF-1 α est rapidement dégradé, le rendant quasiment indétectable. En hypoxie, HIF-1 α est stabilisé, s'accumule et

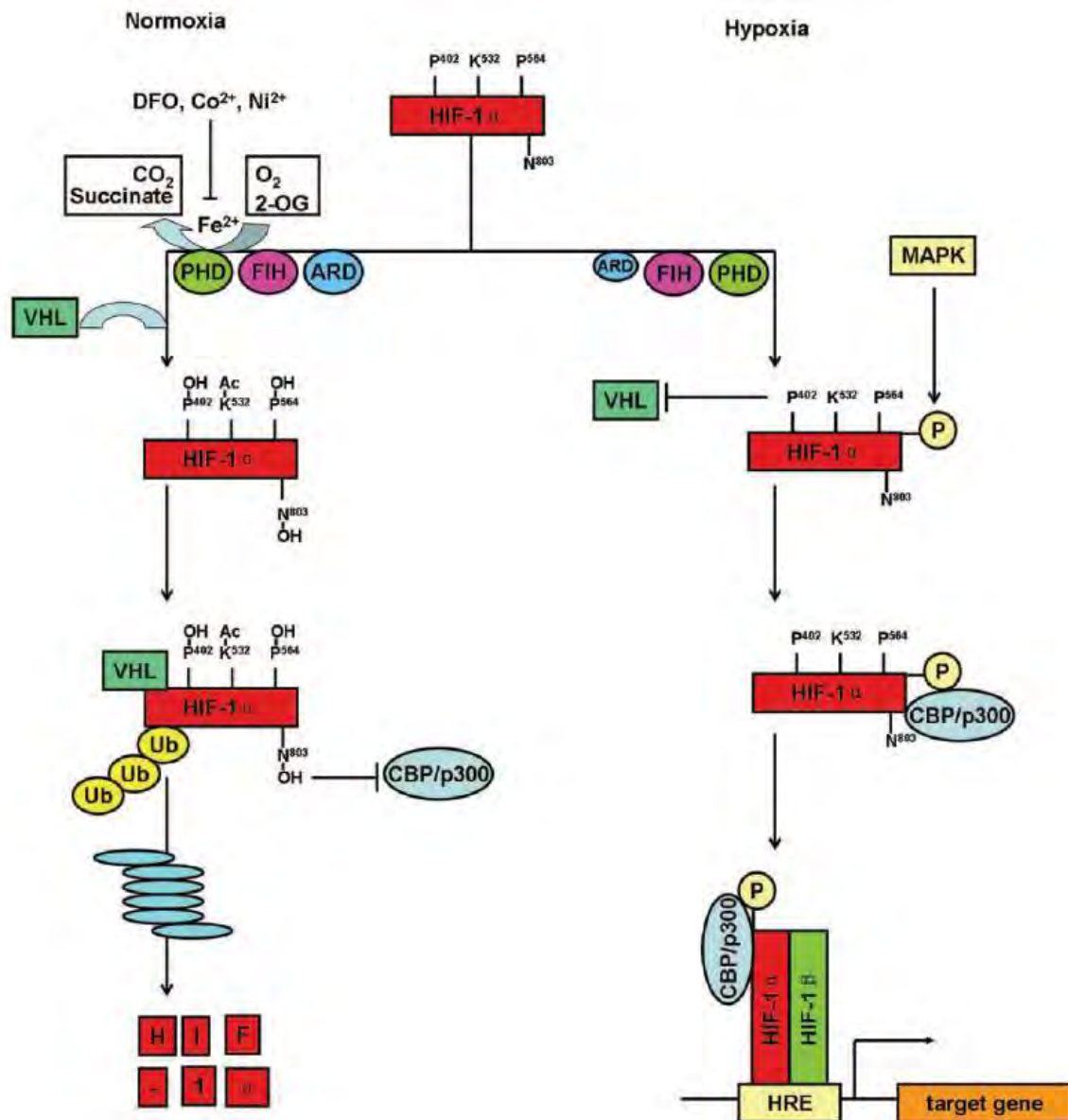


Figure I.15 : Représentation de la régulation dépendante de l'oxygène de la stabilisation de HIF-1 et de son activité de transactivation (Ke and Costa, 2006).

En normoxie (à gauche), deux résidus proline (P) et un résidu asparagine (N) de HIF-1α sont hydroxylés par PHDs et FIH-1 respectivement. L'activité de ces enzymes requiert la présence d'oxygène, du 2-oxoglutarate (2-OG), et de Fe²⁺. Les protéines HIF-1α hydroxylées se lient au complexe pVHL ubiquitine ligase E3, menant à sa dégradation par le protéasome. L'acétylation d'un résidu lysine (K) par ARD1 favorise l'interaction de HIF-1α avec pVHL. L'asparagine hydroxylée bloque le recrutement du co-activateur transcriptionnel CBP/p300.

En hypoxie (à droite), les activités des enzymes PHDs et FIH-1 sont inhibées suite au manque d'O₂, avec pour conséquence la non-hydroxylation des résidus proline et asparagine. Le complexe pVHL ne se lie pas à HIF-1α, qui est alors stabilisé. Les protéines HIF-1α stabilisées migrent dans le noyau où elles se lient aux sous-unités HIF-1β. Ces dernières se lient préférentiellement aux formes HIF-1α phosphorylées par une MAPK. L'asparagine non hydroxylée permet le recrutement de CBP/p300, résultant en la transcription des gènes cibles. De plus, l'expression de ARD1 est diminuée en hypoxie, causant une acétylation plus faible de HIF-1α.

passé du cytoplasme dans le noyau où il dimérise avec HIF-1 β formant ainsi le complexe HIF-1 (Ke and Costa, 2006). Cette translocation nucléaire est contrôlée par la présence d'une séquence NLS (nuclear localization signal) dans la séquence en acides aminés de HIF-1 α (Ke and Costa, 2006; Rocha, 2007). Les complexes se lient alors aux séquences HRE retrouvées dans les régions de régulation des gènes cibles. Des co-activateurs se lient ensuite à HIF-1 pour induire l'expression génique. La stabilité et la fonction de transactivation de HIF-1 α sont fortement régulées par des modifications post-traductionnelles incluant l'hydroxylation, l'ubiquitination, l'acétylation et la phosphorylation. Ces modifications ont lieu dans différents domaines de la protéine. En normoxie, l'hydroxylation de deux résidus proline et l'acétylation d'un résidu lysine du domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD) favorisent l'interaction de HIF-1 α avec la protéine von Hippel-Lindau (pVHL), un suppresseur de tumeur (Ke and Costa, 2006). La liaison du pVHL sur ce domaine conduit à l'assemblage d'un complexe activant l'ubiquitine ligase E3 (Michiels, 2004). Ce complexe entraîne l'ubiquitination de la sous-unité HIF-1 α , la marquant ainsi pour la dégradation par le protéasome 26S (Ke and Costa, 2006). De plus, l'hydroxylation d'un résidu asparagine dans le domaine C-TAD inhibe l'association de HIF-1 α avec CBP/p300 nécessaire à l'activité transcriptionnelle (Ke and Costa, 2006) (Figure I.15).

➤ **Hydroxylation des résidus proline par les prolyl hydroxylases**

HIF-1 α , cytoplasmique et synthétisé *de novo*, est rapidement hydroxylé sur les résidus proline 402 et 564 localisés dans le domaine ODD par des prolyl hydroxylases (PHDs), enzymes de la famille des dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate. Ces PHDs requièrent de l'oxygène pour l'hydroxylation ainsi que le Fe²⁺ et l'ascorbate en tant que cofacteurs. Le processus d'hydroxylation mène à la séparation de l'O₂ en deux atomes dont un est transféré sur le résidu proline et l'autre interagit avec le 2-oxoglutarate pour générer le succinate et le CO₂. En présence d'oxygène, les PHDs sont actives et hydroxylent les résidus proline de HIF- α , constituant un signal de reconnaissance pour la liaison de pVHL menant à l'ubiquitination suivie de la dégradation de HIF- α . En absence d'oxygène, les PHDs sont inactives et elles ne causent donc pas d'hydroxylation, résultant en la stabilisation et l'accumulation de la sous-unité HIF- α . Le besoin d'oxygène pour l'activité de la prolyl hydroxylase fait de celle-ci un senseur direct de l'oxygène. Ces deux résidus proline sont conservés chez HIF-2 α et HIF-3 α . La mutation de ces résidus empêche l'interaction entre pVHL et HIF- α , augmentant sa stabilité en présence d'oxygène, tandis que la mutation d'un seul résidu stabilise HIF- α partiellement (Ke and Costa, 2006). Tel HIF-1 α , HIF-2 α est aussi régulé par l'hydroxylation des résidus proline, entraînant sa dégradation en normoxie. De plus, il a récemment été montré que HIF-3 α subit aussi une dégradation via le protéasome (Hong et al., 2004).

➤ **Polyubiquitination par pVHL – signal pour la dégradation**

Une fois les deux résidus proline convertis en hydroxyproline, pVHL reconnaît spécifiquement HIF-1 α . pVHL s'associe alors avec l'élongine C, l'élongine B, la culline-2 et Rbx1 pour former le complexe VBC-Cul2 E3 ubiquitine ligase. La liaison de HIF-1 α à ce complexe engendre sa polyubiquitination sur des résidus lysine menant à sa dégradation par le protéasome. Le pVHL, tenant son nom de sa découverte dans la maladie de von Hippel-Lindau, est exprimé ubiquitairement et se localise préférentiellement dans le cytoplasme. Néanmoins, son transport du cytoplasme dans le noyau permet la dégradation de HIF-1 α dans les deux compartiments (Ke and Costa, 2006).

➤ **Acétylation d'un résidu lysine par ARD1**

Le résidu lysine 532 dans le domaine ODD est acétylé par une acétyltransférase, ARD1 (arrest-defective-1), transférant le groupement acétyl d'un acétyl-CoenzymeA sur le résidu

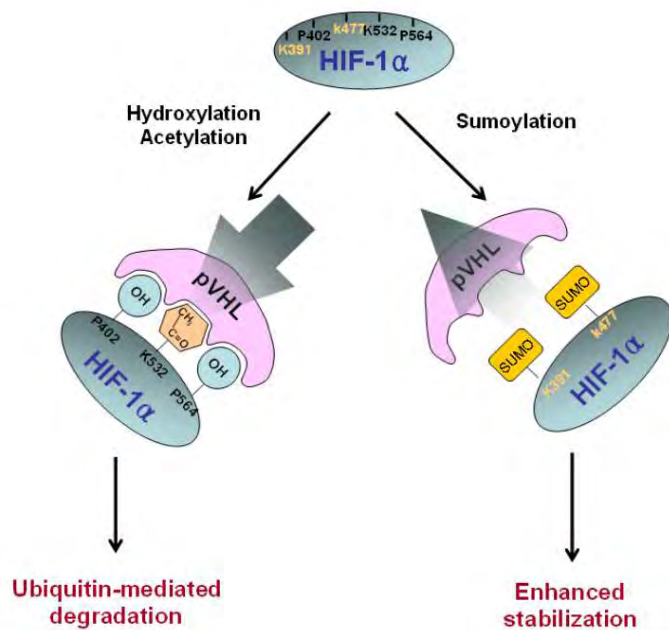


Figure I.16 : Mécanisme moléculaire de la stabilisation de HIF-1 α (Hong et al., 2004).

En normoxie, HIF-1 α est sujet à une rapide dégradation par le protéasome, suite à sa polyubiquitination par pVHL alors que l'hypoxie bloque la dégradation de HIF-1 α conduisant à son accumulation. L'hydroxylation des deux résidus proline et l'acétylation d'un résidu lysine dans le domaine ODD facilitent la liaison de pVHL à HIF-1 α . Par contre, la sumoylation des résidus lysine 391 et 477 dans le domaine ODD pourrait augmenter la stabilité de HIF-1 α par compétition avec l'hydroxylation et l'acétylation, empêchant ainsi la liaison de pVHL.

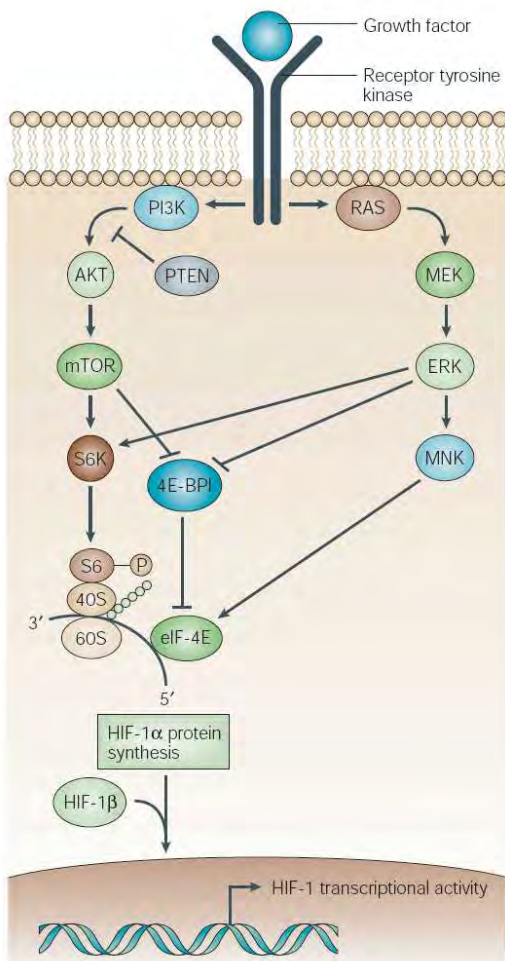


Figure I.17 : Régulation de la synthèse protéique de HIF-1 α (Semenza, 2003).

La liaison d'un facteur de croissance à son récepteur tyrosine kinase active les voies de la PI3K et des MAPK. La PI3K active alors Akt, une sérine/thréonine kinase qui à son tour active mTOR. Dans la voie des MAP kinases initiée par MEK, ERK active alors MNK. ERK et mTOR phosphorylent la 4E-BP1, la protéine liant le eIF-4E, et la kinase S6 p70 (S6K), qui phosphoryle à son tour la protéine ribosomiale S6. La phosphorylation de 4E-BP1 empêche sa liaison à eIF-4E et ne permet pas ainsi d'inhiber la traduction de l'ARNm dépendante de la coiffe. De plus, MNK phosphoryle eIF-4E stimulant ainsi directement son activité. L'effet final de la signalisation induite par le facteur de croissance est une augmentation du taux de traduction des ARNm incluant celui de HIF-1 α .

lysine (Lee et al., 2004). Cette acétylation favorise la liaison entre pVHL et HIF-1 α . L'activité de l'enzyme n'est pas influencée par l'oxygène. Cependant, les niveaux en ARNm et en protéines de ARD1 sont diminués en hypoxie, engendrant un niveau de HIF-1 α acétylé en hypoxie moindre qu'en normoxie (Ke and Costa, 2006).

➤ **Sumoylation de deux résidus lysine**

HIF-1 α est aussi sumoylée par SUMO-1, une famille de petites protéines ressemblant aux ubiquitines. Cette modification conduit à l'augmentation de la stabilité de HIF-1 α et de son activité transcriptionnelle en contrecarrant l'ubiquitination. Il a été rapporté récemment que la sumoylation a lieu sur les résidus lysine 391 et 477 mais pas 532 dans le domaine ODD (Hong et al., 2004) (Figure I.16).

➤ **Hydroxylation de l'asparagine par FIH-1**

Les modifications post-traductionnelles expliquées ci-dessus n'interviennent que sur la stabilisation de HIF-1 α mais ce phénomène seul n'est pas suffisant à l'activité transcriptionnelle complète de HIF-1. Le second mécanisme majeur concerne la modulation des domaines de transactivation N-TAD et C-TAD. Ces domaines fonctionnent en recrutant des co-activateurs tels que CBP/p300, SRC-1 et TIF2. Mais, en normoxie, l'hydroxylation du résidu asparagine 803 dans le C-TAD de HIF-1 α par FIH-1 (factor inhibiting HIF-1), une asparagyl hydroxylase, empêche l'interaction entre CBP/p300 et HIF-1 α nécessaire à l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Par contre, en hypoxie, l'hydroxylation de l'asparagine ne peut se faire, permettant dès lors l'interaction entre le C-TAD de HIF-1 α et CBP/p300 puisque, comme les PHDs, FIH-1 est une dioxygénase uniquement active en présence d'oxygène (Ke and Costa, 2006).

➤ **Phosphorylation par MAPK**

La stabilisation et/ou la synthèse de HIF-1 α en hypoxie est aussi dépendante de la voie PI3 kinase (PI3K)/Akt (Minet et al., 2001). De plus, la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) semble être impliquée dans la phosphorylation de HIF-1 α . Il a en effet été montré *in vitro* que les kinases p42/44 et p38 phosphorylent HIF-1 α et HIF-2 α . La phosphorylation n'affecte pas la stabilité ni la liaison à l'ADN de HIF-1 α mais augmente plutôt l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Ceci pourrait être expliqué par la liaison préférentielle de HIF-1 β aux formes HIF-1 α phosphorylées (Ke and Costa, 2006).

➤ **Autres régulations**

Une S-nitrosylation de la cystéine 800 de HIF-1 α est aussi connue pour augmenter la transactivation grâce à son interaction avec CBP/p300 (Ke and Costa, 2006).

d) Activation non hypoxique de HIF – régulation de HIF-1 indépendante de l'oxygène

L'hypoxie est l'inducteur principal du facteur de transcription HIF. Cependant, l'activation de celui-ci a également été retrouvée en condition de normoxie. Cette activation est due à une augmentation de la synthèse de HIF-1 α via l'activation des voies de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et des MAPK, par exemple par des facteurs de croissance, aboutissant toutes deux à l'augmentation du taux de traduction des ARNm (dont l'ARNm de HIF-1 α) (Figure I.17). Une augmentation de la traduction de HIF-1 α semblerait suffisante pour contrebalancer sa dégradation et permettre son accumulation en normoxie (Semenza, 2003). De plus, comme visible sur la figure I.20, plusieurs facteurs de croissance sont des gènes cibles de HIF-1 tels que IGF2 et TGF- α . Par la suite, la liaison de ces facteurs à leur récepteur conduit à l'augmentation de la synthèse de HIF-1 α , ce qui génère une boucle d'amplification et une signalisation autocrine (Figure I.18) (Semenza, 2003).

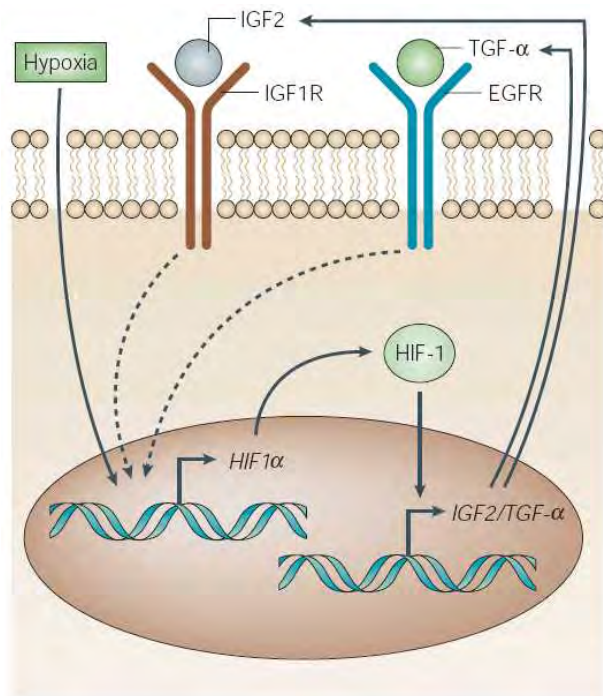


Figure I.18 : Implication de HIF-1 et des facteurs de croissance dans la stimulation autocrine des cellules cancéreuses (Semenza, 2003).

La liaison de facteurs de croissance comme l'IGF2 et le TGF- α à leur récepteur stimule l'expression de HIF-1 α , augmentant la transcription des gènes cibles de HIF-1, incluant IGF2 et TGF- α . L'hypoxie, quant à elle, active HIF-1 via l'accumulation de HIF-1 α dans la cellule, initiant la signalisation autocrine.

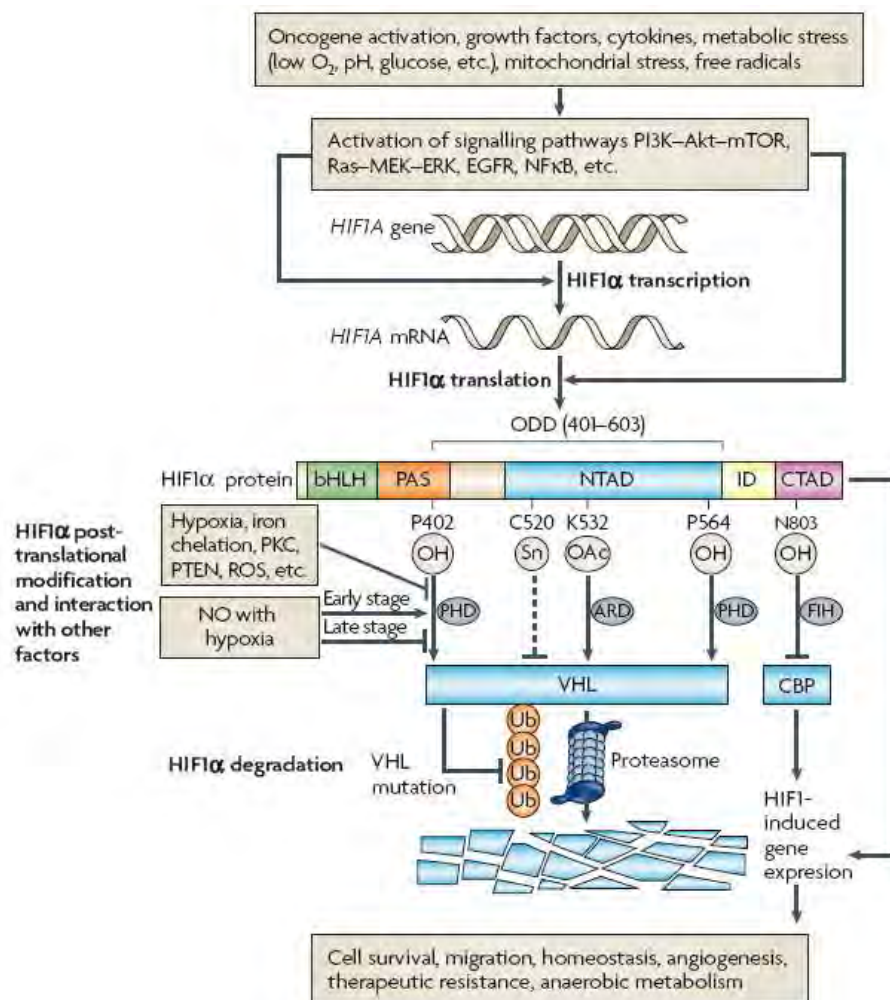


Figure I.19 : Représentation générale de la régulation de HIF-1 dépendante ou indépendante de l'oxygène (Dewhirst et al., 2008).

Alors que HIF-1 β est constitutivement exprimé, l'expression de HIF-1 α est sujette à un grand nombre de points de régulation. Le taux de synthèse de HIF-1 α est contrôlé par l'activation des voies PI3K et MAPK en réponse à divers stimuli. L'activité des PHDs peut aussi être influencée par la PKC, PTEN et les ROS. Le NO a des effets variables sur la stabilité de HIF-1 α en fonction de la durée de l'hypoxie.

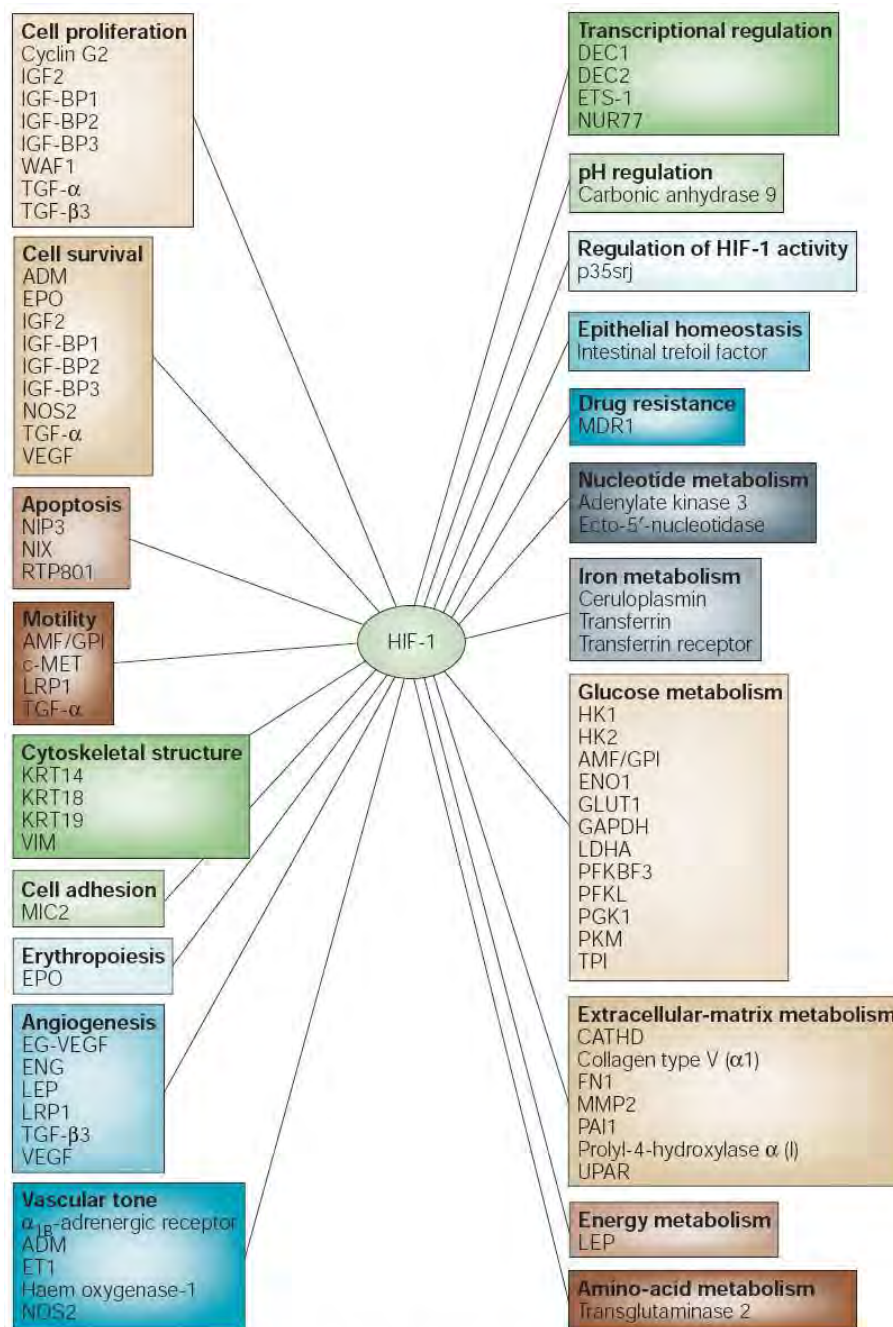


Figure 3 | **Genes that are transcriptionally activated by HIF-1.** Genes that are involved in many processes are transcriptionally activated by HIF-1. ADM, adrenomedullin; ALDA, aldolase A; ALDC, aldolase C; AMF, autocrine motility factor; CATHD, cathepsin D; EG-VEGF, endocrine-gland-derived VEGF; ENG, endoglin; ET1, endothelin-1; ENO1, enolase 1; EPO, erythropoietin; FN1, fibronectin 1; GLUT1, glucose transporter 1; GLUT3, glucose transporter 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase; HK1, hexokinase 1; HK2, hexokinase 2; IGF2, insulin-like growth-factor 2; IGF-BP1, IGF-factor-binding-protein 1; IGF-BP2, IGF-factor-binding-protein 2; IGF-BP3, IGF-factor-binding-protein 3; KRT14, keratin 14; KRT18, keratin 18; KRT19, keratin 19; LDHA, lactate dehydrogenase A; LEP, leptin; LRP1, LDL-receptor-related protein 1; MDR1, multidrug resistance 1; MMP2, matrix metalloproteinase 2; NOS2, nitric oxide synthase 2; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3; PFKL, phosphofructokinase L; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; PAI1, plasminogen-activator inhibitor 1; PKM, pyruvate kinase M; TGF- α , transforming growth factor- α ; TGF- β 3, transforming growth factor- β 3; TPI, triosephosphate isomerase; VEGF, vascular endothelial growth factor; UPAR, urokinase plasminogen activator receptor; VEGFR2, VEGF receptor-2; VIM, vimentin.

Figure I.20 : Gènes transcriptionnellement activés par HIF-1 (Semenza, 2003).

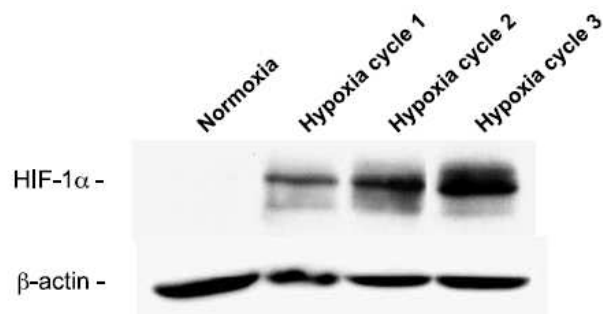


Figure I.21 : Visualisation de l'abondance protéique de HIF-1 α en western blot dans des cellules endothéliales au cours de l'hypoxie intermittente (3 cycles d'1h d'hypoxie/30 min de réoxygénation) (Martinive et al., 2006). Les lysats ont été récupérés avant les cycles et à la fin de chaque hypoxie. On remarque que l'abondance de HIF-1 α augmente au fur et à mesure des cycles, suggérant une augmentation de sa stabilisation.

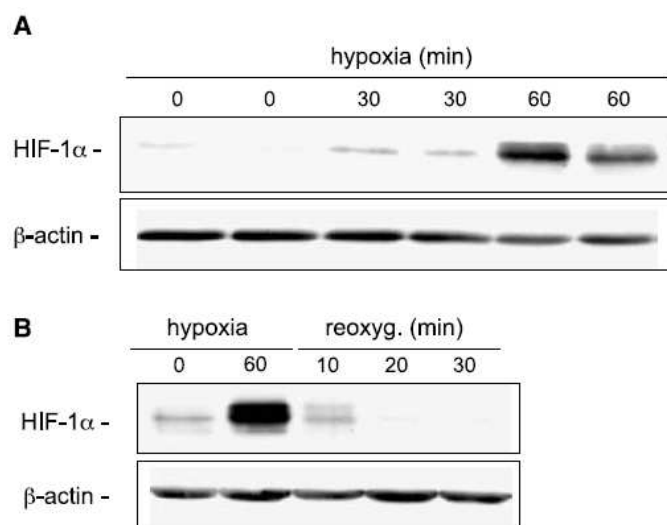


Figure I.22 : Visualisation de l'abondance de HIF-1 α en western blot à différents temps d'hypoxie et de réoxygénation (lysats de cellules endothéliales) (Martinive et al., 2006). Les cellules endothéliales ont été exposées à 0, 30 et 60 minutes d'hypoxie (**A**) et ont ensuite été réoxygénées pendant 10, 20, 30 minutes (**B**). 1h d'hypoxie est suffisante pour atteindre une forte expression de HIF-1 α dans les cellules endothéliales tandis que la phase de réoxygénation provoque une rapide diminution de son abondance.

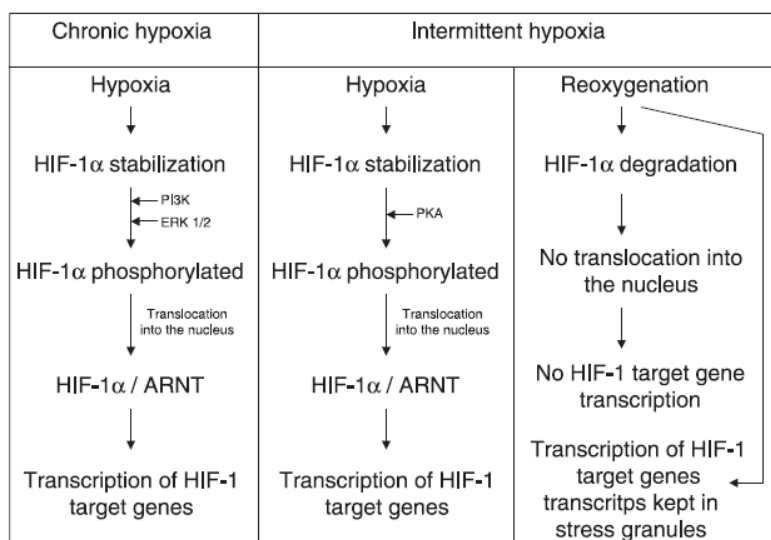


Figure I.23 : Phosphorylation de HIF-1 α et transcription des gènes cibles de HIF-1 en hypoxie chronique et en hypoxie intermittente (Toffoli and Michiels, 2008).

Outre la synthèse de HIF-1 α , l'activation de la voie RAF-MEK-ERK stimule aussi la fonction de transactivation de HIF-1 en phosphorylant le co-activateur p300. Au contraire de l'hypoxie induisant une stabilisation de HIF-1 α dans toutes les cellules, la régulation de l'activité de HIF-1 par les voies de signalisation des facteurs de croissance est spécifique à certains types de cellules (récapitulatif de la régulation de HIF-1 à la figure I.19).

e) Gènes cibles de HIF-1

L'activité de HIF-1 entraîne la surexpression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la survie cellulaire, le métabolisme du glucose et la migration cellulaire. Plus de 60 gènes cibles de HIF-1 ont déjà été identifiés (Hong et al., 2004; Lee et al., 2004; Semenza, 2003) (Figure I.20).

f) Régulation de HIF-1 α en hypoxie intermittente

Des courtes périodes d'hypoxie suffisent à l'activation de HIF-1. En effet, Martinive et al. et Toffoli et al. ont montré une augmentation de la stabilisation de HIF-1 α au cours de cycles d'hypoxie (1h) / réoxygénation (30 min) (Figure I.21). Ils ont aussi mis en évidence que ces cycles permettent la dégradation complète de HIF-1 α durant chaque période de 30 minutes de réoxygénation (Martinive et al., 2006; Toffoli et al., 2007) (Figure I.22). La dégradation de HIF-1 α après chaque réoxygénation rend HIF-1 inactif. Ce dernier est donc transcriptionnellement actif uniquement durant les périodes d'hypoxie (Toffoli and Michiels, 2008). Bien que l'hypoxie intermittente induise, comme l'hypoxie chronique, la stabilisation de HIF-1 α et l'activité transcriptionnelle de HIF-1, certaines différences majeures entre ces deux types d'hypoxie ont été révélées notamment au travers de voies de régulation différentes pour l'activité de HIF-1 (Figure I.23). En effet, il a été montré sur des cellules EAhy926 et PC12 qu'en hypoxie intermittente, les kinases ERK1/2 (MAPK p44 et p42 respectivement) et PI3K ne sont pas requises pour la phosphorylation de HIF-1 α et donc pour l'activité transcriptionnelle de HIF-1, alors que l'inhibition de ces kinases en hypoxie chronique diminue l'expression des gènes cibles. Par contre, Toffoli et al. ont montré que la PKA est impliquée dans la phosphorylation de HIF-1 α en hypoxie intermittente mais pas en hypoxie chronique, et que l'inhibition de la PKA diminue la transcription des gènes cibles de HIF-1 en hypoxie intermittente (Toffoli et al., 2007).

2.4. Effets de l'hypoxie intermittente – Hypoxie et réoxygénation (Figures I.24 et I.25)

L'hypoxie intermittente touche les cellules tumorales et les cellules endothéliales du réseau sanguin tumoral et est à l'origine de changements phénotypiques reflétant des modifications de l'expression génique. Certains effets phénotypiques de l'hypoxie intermittente sur les cellules endothéliales ont déjà été montrés *in vitro*. Martinive et al. ont observé que les cellules endothéliales préexposées à une hypoxie intermittente et consécutivement aux radiations ionisantes ont une migration et une capacité à s'assembler en des structures tubulaires augmentées de plus ou moins 3 fois par rapport aux cellules endothéliales exposées à la normoxie et non irradiées (Martinive et al., 2006; Toffoli et al., 2009). De surcroît, Toffoli et al. ont découvert que l'hypoxie intermittente seule favorise la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de structures tubulaires par rapport à la normoxie ou l'hypoxie chronique (Toffoli et al., 2009). Ainsi, l'hypoxie intermittente pourrait protéger les cellules endothéliales tantôt de manière directe en agissant sur leur expression de gènes, et tantôt de manière indirecte en agissant sur les cellules tumorales qui vont alors sécréter des molécules influençant la survie des cellules endothéliales (voir point 2.1) (Toffoli and Michiels, 2008).

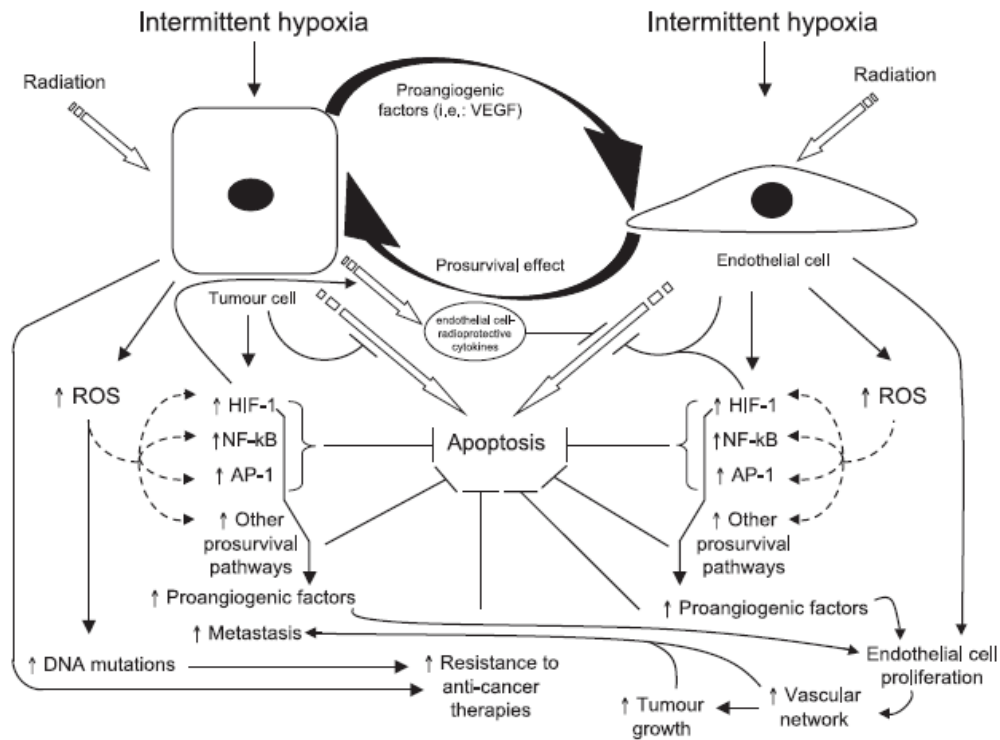


Figure I.24 : Effets de l'hypoxie intermittente sur les cellules cancéreuses et endothéliales d'une tumeur (Toffoli and Michiels, 2008).

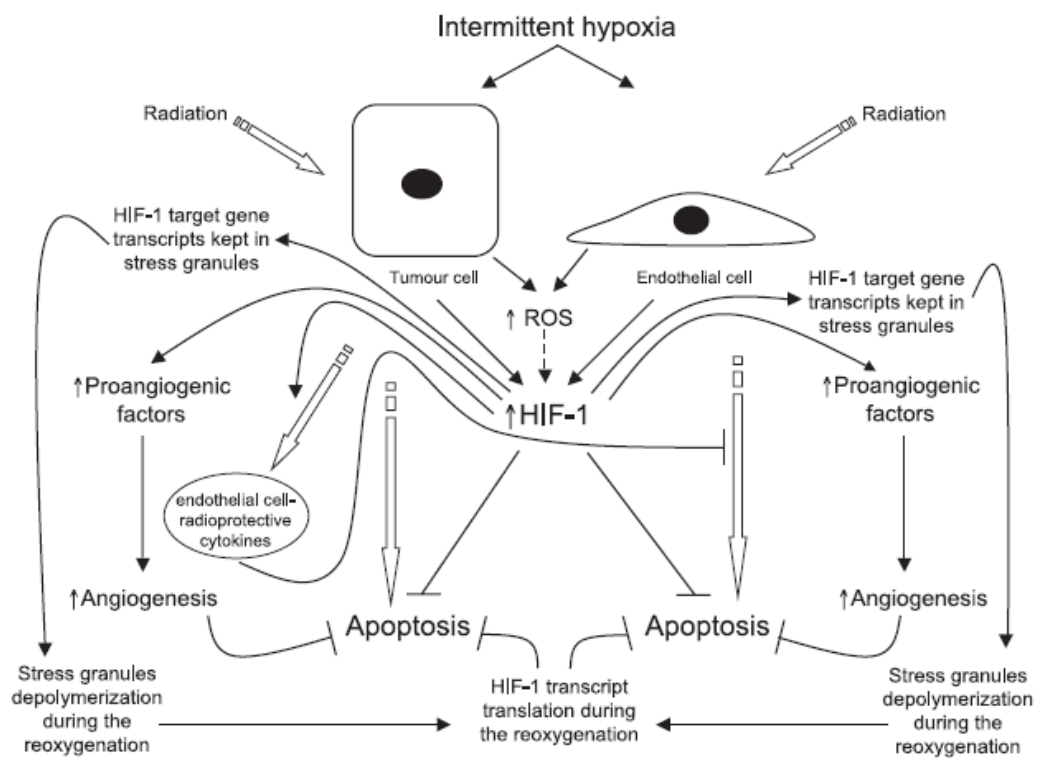


Figure I.25 : Effets de l'activation de HIF-1 par l'hypoxie intermittente sur les cellules cancéreuses et endothéliales d'une tumeur (Toffoli and Michiels, 2008).

Les périodes de réoxygénation, caractéristiques de l'hypoxie intermittente, pourraient stimuler la signalisation induite par HIF-1. Moeller et al. ont en effet observé la formation de granules de stress contenant un pool de transcrits régulés par HIF-1 dans les cellules tumorales en hypoxie ainsi que leur dépolymérisation pendant la période de réoxygénation permettant une traduction rapide de ces transcrits séquestrés (Moeller et al., 2004). Ces granules sont des complexes protéines-ARNm qui se forment pendant les périodes de stress et qui empêchent ainsi la cellule d'utiliser de l'énergie pour la traduction en protéines (Dewhirst et al., 2008). Moeller et al. suggèrent en plus que ce processus de régulation post-transcriptionnelle aiderait les cellules tumorales à se remettre d'un choc hypoxique et à se préparer à un nouveau stress (Moeller et al., 2004).

De plus, l'instabilité génétique, engendrée par l'hypoxie intermittente et favorisant la résistance aux traitements anti-tumoraux, est aussi bien liée aux périodes d'hypoxie qu'aux périodes de réoxygénation. En effet, pendant les périodes d'hypoxie, la réduction de l'activité des enzymes nécessaires à la réparation de l'ADN comme les topoisomérases, hélicases et ligases, est couramment observée et se caractérise par la présence de cassures dans les brins d'ADN, de translocations, de transversions et autres réarrangements chromosomiques responsables de la résistance tumorale. L'hypoxie induit donc une élévation de 3 à 4 fois de la fréquence des mutations, et des niveaux élevés de mutagenèse sont retrouvés dans des cellules exposées plusieurs fois à l'hypoxie. D'autre part, pendant les périodes de réoxygénation, des stress oxydatifs sont générés et sont aussi responsables de dommages à l'ADN, avec une augmentation de la 8-oxoguanine, encodant pour une adénine à la place d'une guanine et menant ainsi à des transversions (de C:G à A:T) (Toffoli and Michiels, 2008).

En plus d'entraîner des dommages à l'ADN, les ROS (Reactive Oxygen Species) produits lors des phases de réoxygénation jouent également un rôle important dans la modification de l'expression de gènes via la régulation de facteurs de transcription comme AP-1 et NF- κ B. AP-1 intervient dans la tumorigenèse en régulant l'expression et la fonction de régulateurs du cycle cellulaire (cycline D1, p53, p21, p19, p16) tandis que NF- κ B régule la transcription de gènes codant pour des inhibiteurs de l'apoptose (cIAPs, Bcl-X_L, FLIP), des régulateurs de la prolifération (IL-2, les cyclines G1), des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, IL-8) et des enzymes dégradant la MEC (MMPs) (Karin et al., 2002; Matthews et al., 2007). Il est à noter que l'activation de NF- κ B par les ROS dépend fortement du type cellulaire (Gloire et al., 2006).

3) Le microenvironnement tumoral

Le cancer a longtemps été défini comme une maladie caractérisée par la présence de cellules transformées acquérant de l'autonomie pour la prolifération, l'immortalisation et l'invasion. Les premières thérapies anti-cancéreuses se sont donc centrées sur le ciblage des cellules tumorales (Lorusso and Ruegg, 2008). Cependant, de plus en plus de découvertes ont indiqué la nécessité de considérer l'oncogenèse comme une maladie impliquant des interactions multicellulaires hétérotypiques dans un tissu nouvellement formé. Actuellement, le microenvironnement tumoral est cité comme étant essentiel et faisant partie intégrante du tissu cancéreux (Hanahan and Weinberg, 2000). L'inflammation inhérente au microenvironnement tumoral est d'ailleurs actuellement considérée comme la septième caractéristique du cancer (Mantovani, 2009; Mantovani et al., 2008a; Wu and Zhou, 2009), rejoignant les six autres caractéristiques clés répertoriées par Hanahan et Weinberg (Hanahan

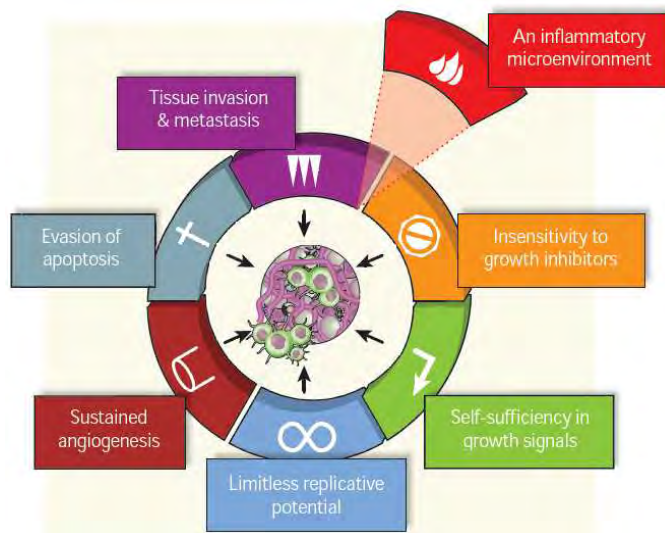


Figure I.26 : Le microenvironnement inflammatoire tumoral comme septième caractéristique du cancer (Mantovani, 2009).

En 2000, Hanahan et Weinberg avait proposé un modèle définissant les six propriétés qu'une tumeur acquiert au cours de son développement (voir Figure I.2) (Hanahan and Weinberg, 2000). Mantovani revisite ce modèle en proposant de rajouter une septième caractéristique intervenant dans la croissance cancéreuse : le microenvironnement inflammatoire. Il justifie cette propriété en soulignant que la formation de métastases nécessite, en plus des propriétés intrinsèques aux cellules tumorales, la présence de facteurs du microenvironnement.

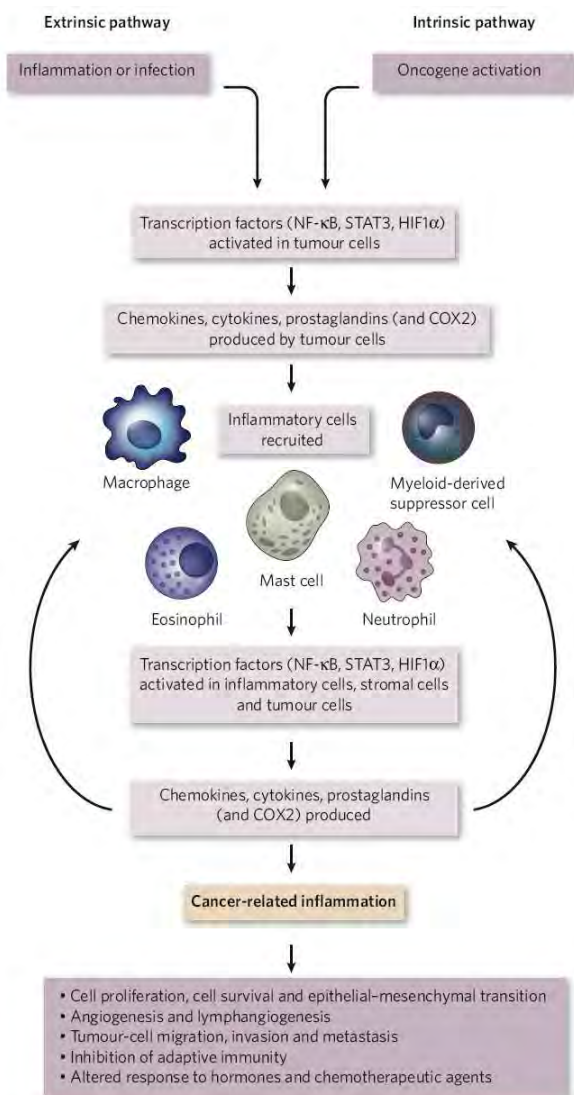


Figure I.27 : Voies intrinsèque et extrinsèque liant l'inflammation et le cancer (Mantovani et al., 2008).

Le cancer et l'inflammation sont interconnectés par deux voies. La voie intrinsèque est activée par des événements génétiques causant soit l'activation d'oncogènes par mutation, réarrangement chromosomique ou amplification, ou soit l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Les cellules transformées produisent des médiateurs inflammatoires générant alors un microenvironnement tumoral inflammatoire sans condition d'inflammation précédente. La voie extrinsèque est, quant à elle, caractérisée par des conditions inflammatoires ou infectieuses augmentant le risque de développement d'un cancer. Les deux voies convergent vers l'activation de facteurs de transcription (principalement NF-κB, STAT3 et HIF1) dans les cellules tumorales. Ces facteurs conduisent à la production de médiateurs inflammatoires ainsi qu'à l'induction de la COX2 (nécessaire à la synthèse de prostaglandines). Ces médiateurs recrutent divers leucocytes. Les cytokines activent les mêmes facteurs de transcription dans les cellules inflammatoires, stromales et tumorales, engendrant la formation d'un microenvironnement tumoral inflammatoire auto-entretenu. Cette inflammation favorise la progression tumorale.

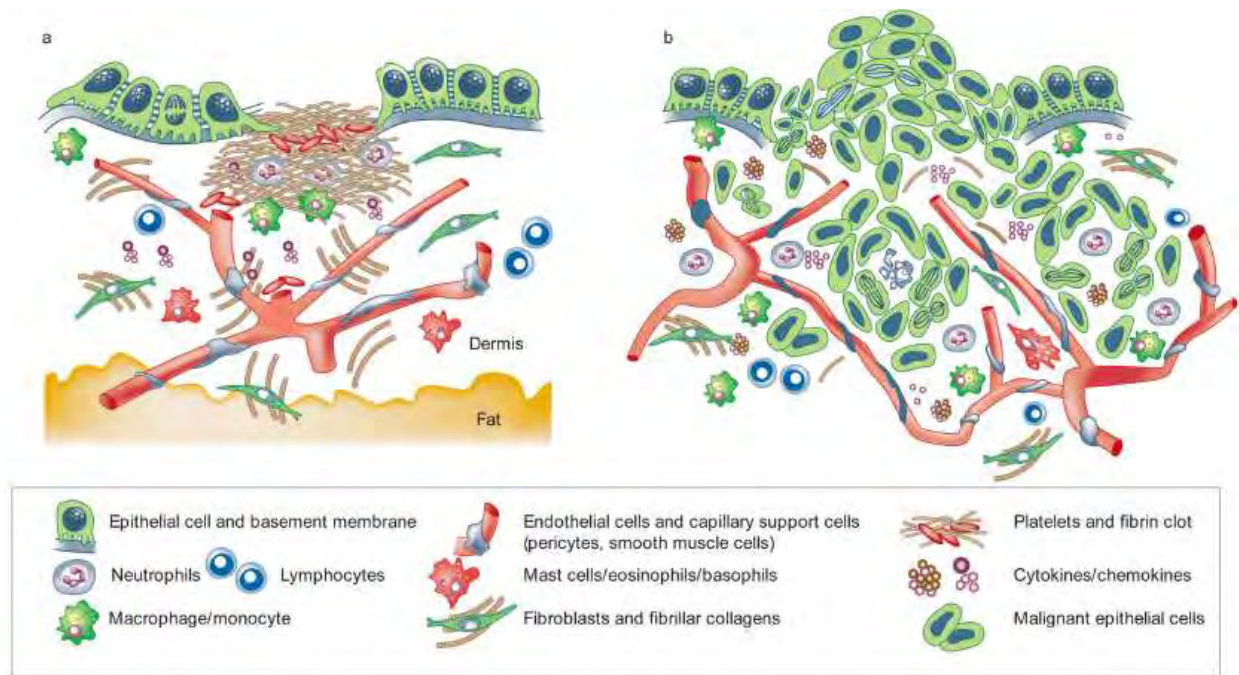


Figure I.28 : Guérison de la blessure versus croissance tumorale invasive (Coussens and Werb, 2002).

- a) Les tissus normaux présentent une architecture hautement organisée. Les cellules épithéliales siégeant au-dessus de la membrane basale sont séparées du compartiment stromal vascularisé. Par la blessure, les plaquettes sont activées et forment un bouchon hémostatique duquel elles relargent des médiateurs vasoactifs qui régulent la perméabilité vasculaire, l'influx du fibrinogène et la formation d'un caillot de fibrine. Les facteurs chimiotactiques comme le TGF- β et le PDGF libérés par les plaquettes activées initient la formation du tissu, l'activation des fibroblastes et l'induction et activation d'enzymes protéolytiques nécessaires pour le remodelage de la MEC. En parallèle, les granulocytes, monocytes et fibroblastes sont recrutés, le réseau vasculaire est restauré et la réépithélialisation de la blessure a lieu.
- b) Les carcinomes invasifs sont moins bien organisés. L'angiogenèse et la lymphangiogenèse produisent une organisation vasculaire chaotique où les cellules tumorales interagissent avec les autres types cellulaires et avec une MEC remodelée. Les cellules néoplasiques produisent une large gamme de chémokines et de cytokines qui sont mitogéniques et/ou chémoattractives pour les granulocytes, les mastocytes, les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Ces fibroblastes activés et ces cellules inflammatoires infiltrées sécrètent ensuite des enzymes protéolytiques, cytokines et chémokines. Ces facteurs potentialisent la croissance tumorale, stimulent l'angiogenèse, induisent la migration des fibroblastes et leur maturation, et rendent possible la dispersion des cellules tumorales via leur engagement dans les réseaux sanguin et lymphatique.

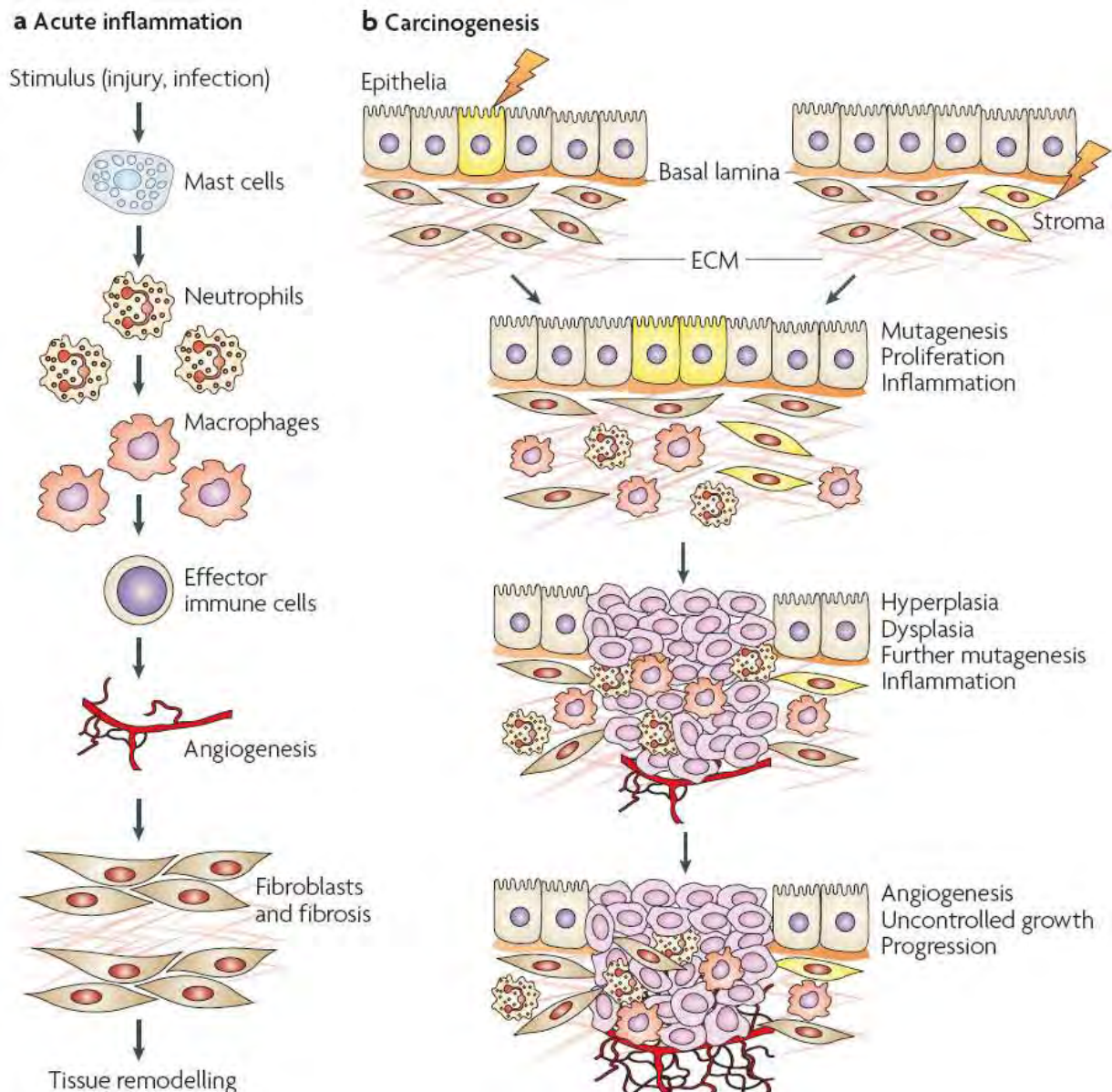


Figure I.29 : Corrélations et contrastes entre l'inflammation aiguë et la carcinogénèse (Albini and Sporn, 2007).

- a) L'inflammation aiguë menant à la réparation tissulaire est caractérisée par une séquence d'événements se déroulant dans un ordre précis depuis l'élimination des pathogènes étrangers jusqu'au remodelage tissulaire établissant une homéostasie. Tout d'abord, les cellules résidentes sont activées et les granulocytes répondent rapidement à l'attaque. Ensuite, les macrophages sont recrutés et les cellules immunitaires effectrices (lymphocytes) s'infiltrent pour permettre les réponses immunitaires spécifiques. Enfin, les cellules mésenchymateuses telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes sont recrutées et activées pour former de nouveaux vaisseaux sanguins et une nouvelle matrice de collagène amenant au remodelage tissulaire. Ainsi, dans les étapes initiales, l'inflammation est agressive détruisant les pathogènes exogènes et le tissu de l'hôte. Elle est ensuite suivie par une réponse favorisant la survie cellulaire et la régénération tissulaire.
- b) Au contraire de l'ordre précis du déroulement des événements de l'inflammation aiguë et la réparation tissulaire, pendant une inflammation chronique non résolue ou au cours de la carcinogénèse, les événements sont désorganisés et l'homéostasie n'est pas accomplie. Pendant la carcinogénèse, les cellules épithéliales ou stromales peuvent initialement subir des altérations entraînant des mutations et une prolifération incontrôlée. Cette altération mène ensuite à une réponse inflammatoire qui favorise la croissance tumorale via l'activation du stroma et spécialement la néovascularisation. L'hyperplasie et la dysplasie continues conduisent à un état néoplasique invasif.
- Les changements génétiques ou épigénétiques dans l'épithélium ou le stroma sont montrés en jaune.

and Weinberg, 2000) (Figure I.26). Ainsi, la seule prolifération des cellules transformées ne cause pas le cancer tandis que leur prolifération dans un environnement riche en cellules inflammatoires, en facteurs de croissance, en stroma activé et en agents engendrant des dommages à l'ADN potentialise et favorise le développement des tumeurs (Ruegg, 2006).

3.1. Origines du cancer : lien entre l'inflammation et le cancer

Le lien entre l'inflammation et le cancer a été proposé en 1863 par Rudolf Virchow, lorsqu'il a observé la présence de leucocytes dans les tissus tumoraux (Balkwill and Mantovani, 2001). La connexion entre le cancer et l'inflammation peut s'installer selon deux voies : une voie extrinsèque déterminée par une inflammation chronique locale qui occasionne des dommages aux cellules avoisinantes et, une voie intrinsèque conduite par des altérations génétiques conduisant à la transformation cellulaire et puis au développement de l'inflammation tumorale (Mantovani et al., 2008a) (Figure I.27). Il a été observé que la probabilité d'apparition de cellules transformées augmente dans des régions d'infection et d'inflammation chronique, à l'origine d'approximativement 25% des cancers humains (Coussens and Werb, 2002; Wu and Zhou, 2009). En effet, des infections persistantes telles que celles induites par le virus de l'hépatite C, le parasite *Schistosoma*, et la bactérie *Helicobacter pylori* sont à l'origine d'une inflammation chronique. Les leucocytes et autres cellules phagocytaires induisent des dommages à l'ADN dans les cellules en prolifération via la génération de ROS et RNS produits normalement par ces cellules pour combattre l'infection. Les espèces RNS agissent sous forme de peroxy-nitrite, un agent mutagène. Dès lors, des dommages tissulaires répétés et la régénération incessante du tissu conduisent à des altérations génomiques permanentes comme des mutations ponctuelles, des délétions et des réarrangements (Coussens and Werb, 2002). C'est la voie extrinsèque. Au contraire, dans le cas de la voie intrinsèque, des événements génétiques induisant la transformation cellulaire sont les événements primaires du développement tumoral. Ces événements incluent l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de gènes « suppresseur de tumeur » via une mutation, un réarrangement chromosomique ou une amplification. Les cellules transformées engendrent alors la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire tumoral par la production de médiateurs recrutant et activant des leucocytes. Ces médiateurs activent des facteurs de transcription comme NF- κ B dans les cellules inflammatoires, stromales et tumorales du microenvironnement, amplifiant et perpétuant l'inflammation liée au cancer (Mantovani et al., 2008a).

En 1986, les tumeurs ont été définies comme des blessures qui ne parviennent pas à guérir (Dvorak, 1986). La guérison d'une blessure et le cancer partagent un certain nombre de similarités puisque ces deux processus impliquent la prolifération cellulaire, la survie et la migration qui sont contrôlées par des facteurs de croissance, des cytokines ainsi que des signaux inflammatoires et angiogéniques dérivés du microenvironnement de la blessure ou de la tumeur. La fonction cruciale de l'inflammation dans la guérison de la blessure consiste en la destruction des agents infectieux et en la réparation du tissu endommagé. L'inflammation aiguë déclenchée pour la guérison de la blessure est rapidement contrôlée et diminuée au contraire de l'inflammation persistante et chronique retrouvée dans le cancer (Coussens and Werb, 2002) (Figure I.28). L'inflammation aiguë se déroule dans un ordre précis d'événements conduisant à la réparation tissulaire avec une production de cytokines anti-inflammatoires remplaçant les cytokines pro-inflammatoires, ce qui n'est pas retrouvé dans le cas d'une inflammation chronique non résolue ou du développement tumoral (Albini and Sporn, 2007; Coussens and Werb, 2002) (Figure I.29).

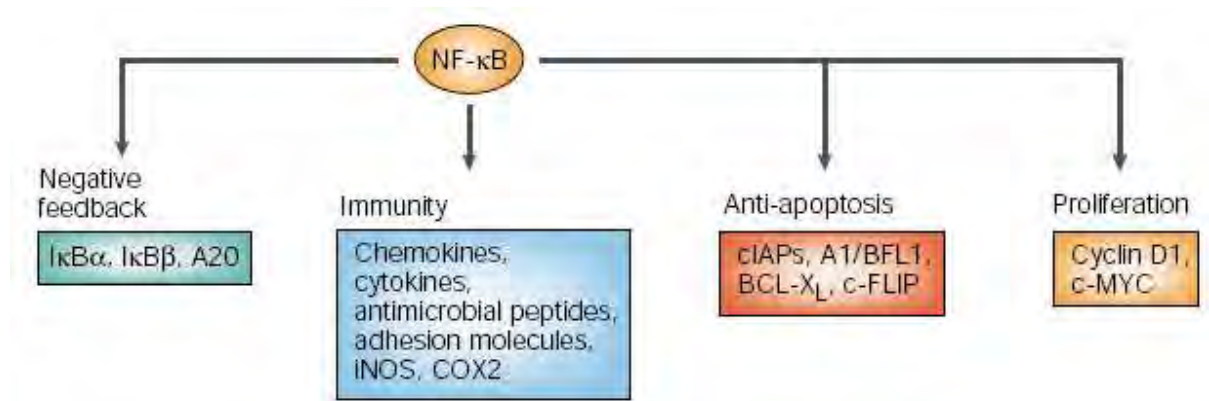


Figure I.30 : Induction de quatre grandes classes de gènes par NF-κB (Karin et al., 2002).

Les gènes induits en réponse à l'activation du facteur de transcription NF-κB peuvent être classés en quatre groupes fonctionnels. En effet, les produits de ces gènes sont impliqués dans le contrôle négatif de l'activité de NF-κB, dans des fonctions immunorégulatrices diverses, dans l'inhibition de l'apoptose et dans la prolifération cellulaire.

COX2, cyclooxygenase-2; FLIP, FLICE (FAS-associated death domain (FADD)-like IL-1β-converting enzyme) inhibitory protein; cIAPs, cellular inhibitors of apoptosis; IκBα, inhibitor κBα; IκBβ, inhibitor of κBβ; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

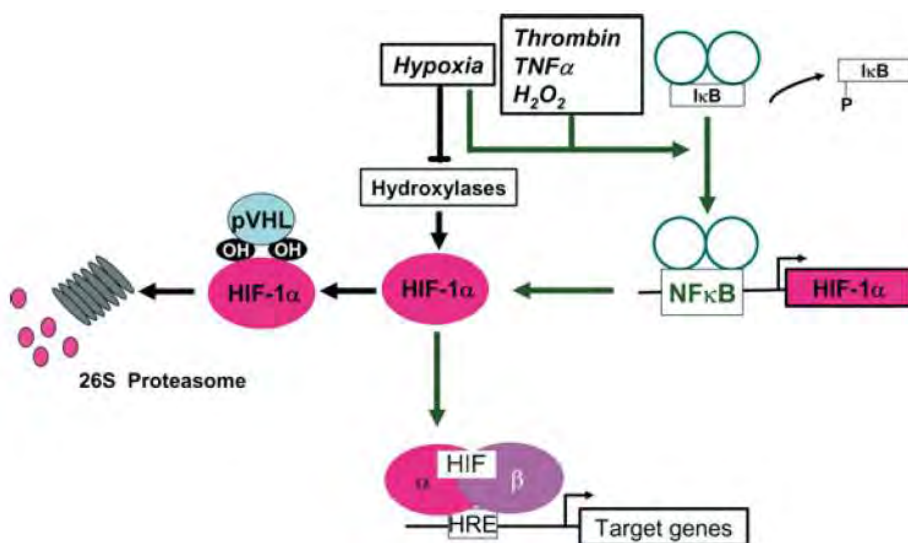


Figure I.31 : Représentation schématique du lien entre les voies HIF-1 et NF-κB (Gorlach and Bonello, 2008).

L'hypoxie à court terme ou une stimulation avec de la thrombine, des ROS comme le H_2O_2 , ou du $TNF-\alpha$ mènent à la phosphorylation d'IκB et donc à la libération de NF-κB. Ce dernier peut ensuite se lier sur un site de liaison spécifique au niveau du promoteur de HIF-1α, ce qui conduit à l'augmentation de ses niveaux en ARNm et en protéines.

En plus de l'inflammation, les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement se retrouvent dans des conditions d'hypoxie. Toutes ces cellules y répondent notamment par la sécrétion de facteurs de croissance et cytokines tels que CSF-1 (colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-monocyte), TGF- β et des chémokines, faisant ainsi de l'hypoxie un des responsables de l'amplification de l'inflammation (Robinson and Coussens, 2005).

3.2. Les facteurs clés de l'inflammation liée au cancer

Quelques facteurs endogènes clés participant à l'inflammation liée au cancer ont été identifiés. Ceux-ci incluent des facteurs de transcription comme NF- κ B, STAT3 et HIF-1 et des cytokines inflammatoires majeures comme IL-1 β , IL-6, IL-23 et TNF- α . NF- κ B constitue un coordinateur central de l'immunité innée et de l'inflammation faisant de lui un important promoteur tumoral endogène et un des principaux liens entre l'inflammation et la tumorigenèse (Lorusso and Ruegg, 2008; Mantovani et al., 2008a). NF- κ B agit en aval de l'activation de la voie TLR (Toll-like receptor)-MyD88 et des voies de signalisation médiées par le TNF- α et l'IL-1 β . Il induit l'expression de gènes encodant des cytokines inflammatoires, des molécules d'adhérence, des enzymes de la voie de synthèse des prostaglandines (telles que COX2) stimulant la prolifération et la mobilité des cellules tumorales ainsi que l'angiogenèse, la iNOS et des facteurs angiogéniques. Il contribue aussi la survie cellulaire en induisant des gènes anti-apoptotiques comme Bcl-2 et les IAPs (Mantovani et al., 2008a) (Figure I.30). L'activité endothéliale de NF- κ B corrèle avec l'angiogenèse et l'inhibition de ce facteur a un effet anti-angiogénique (Albini and Sporn, 2007). De plus, les interconnexions entre les voies NF- κ B et HIF-1 sont de plus en plus évidentes, liant l'immunité innée et la réponse à l'hypoxie (Mantovani et al., 2008a). En effet, l'activation des sous-unités p50 et p65 de NF- κ B par l'hypoxie, le H₂O₂ et le TNF- α a été rapportée pour contribuer à une expression basale en ARNm et en protéines de HIF-1 α . En fait, les sous-unités p50 et p65 peuvent interagir directement sur un site consensus NF- κ B dans le promoteur de HIF-1 α (Gorlach and Bonello, 2008) (Figure I.31). Kuo et al. ont aussi montré que le TNF- α peut induire l'accumulation de HIF-1 α via IKK β en normoxie et en hypoxie (Kuo 2009). HIF-1, par son activité transcriptionnelle sur ses gènes cibles (voir Figure I.20), contribue à un phénotype invasif (par exemple MMP-2, cathepsine D) et favorise l'angiogenèse (VEGF) (Albini and Sporn, 2007). STAT3 est constitutivement activé dans les cellules tumorales et immunes et est impliqué dans l'oncogenèse et l'inhibition de l'apoptose. Son activation dans les cellules tumorales augmente la capacité des tumeurs à échapper au système immunitaire en inhibant la maturation des cellules dendritiques et en supprimant la réponse immune (Mantovani et al., 2008a). L'inhibition de STAT3 a d'ailleurs été montrée pour conduire à l'augmentation de la cytotoxicité et de la présentation des antigènes par les macrophages activés, et est associée à un retard de la croissance tumorale (Allavena et al., 2008b). STAT, NF- κ B et HIF-1 sont donc trois facteurs de transcription intimement impliqués dans la régulation de l'inflammation, l'angiogenèse et l'échappement au système immunitaire (Albini and Sporn, 2007; Mbeunkui and Johann, 2009).

3.3. Composition cellulaire du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est composé de nombreux types cellulaires, tous participant à la progression de la tumeur : des cellules endothéliales et leurs précurseurs, des péricytes, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des CAFs (carcinoma-associated fibroblasts), des myofibroblastes, des neutrophiles, des éosinophiles, des basophiles, des mastocytes, des lymphocytes B et T, des cellules NK (natural killer), et des cellules présentatrices d'antigène comme les macrophages et les cellules dendritiques (Albini and Sporn, 2007; Coussens and

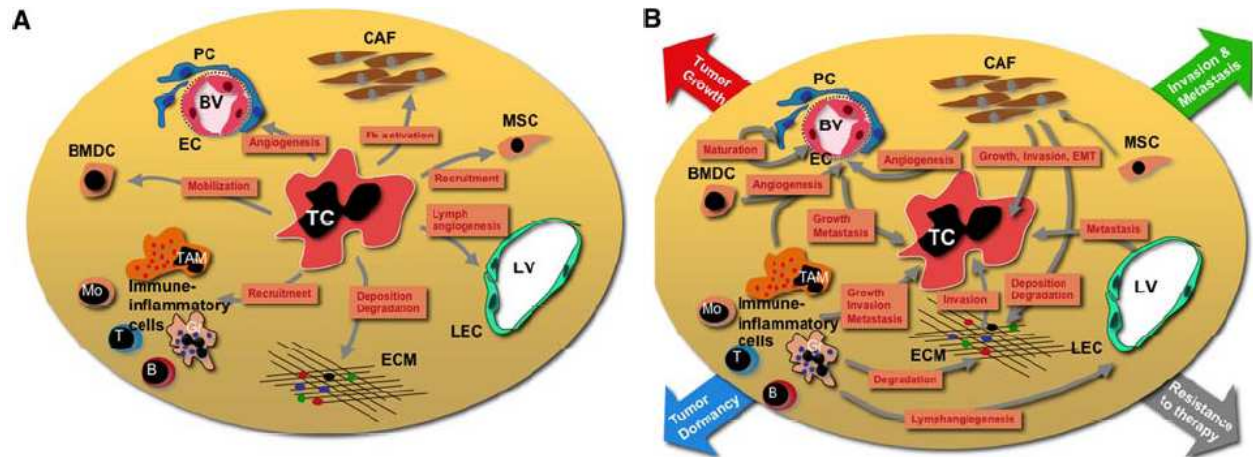


Figure I.32 : Représentation des interactions cellulaires hétérotypiques dans le microenvironnement tumoral (Lorusso and Ruegg, 2008).

- Les cellules tumorales orchestrent les modifications du microenvironnement tumoral en attirant et activant beaucoup de cellules non tumorales telles que des cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, des péricytes, des CAFs (carcinoma-associated fibroblasts), des cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC), et des cellules immunes (TAMs, monocytes, lymphocytes B et T). Les cellules tumorales peuvent aussi modifier la MEC. La plupart de ces modifications stromales commencent rapidement pendant la progression tumorale, souvent à la transition entre les lésions pré-malignes et malignes. Cette situation peut aussi se retrouver avant la formation du cancer dans le cas par exemple d'inflammation chronique.
- En réponse à ces modifications stromales, le microenvironnement va favoriser la progression tumorale via la croissance et la survie des cellules tumorales et faciliter l'invasion et la métastase. Le microenvironnement déterminera l'état de la progression tumorale : la croissance de la tumeur, la dormance, l'invasion et la métastase, la résistance aux thérapies.

B : lymphocyte B ; BMDC : bone marrow-derived cells ; BV : blood vessel ; CAF : carcinoma-associated fibroblast ; EC : endothelial cell ; ECM : extracellular matrix ; EMT : epithelial to mesenchymal transition ; Gr : granulocyte ; LEC : lymphatic endothelial cell ; LV : lymphatic vessel ; Mo : monocyte ; MSC : mesenchymal stem cell ; PC : pericyte ; T : lymphocyte T ; TAM : tumor associated macrophage ; TC : tumor cell

Werb, 2002) (Figure I.32). Les CAFs sont les plus abondants dans le microenvironnement tumoral. Ils se différencient localement à partir de fibroblastes normaux du stroma ou à partir de cellules souches mésenchymateuses recrutées au site tumoral (Lorusso and Ruegg, 2008).

3.4. Polarisation des cellules immunitaires

Au début des années 1900, Paul Ehrlich, le fondateur de la chimiothérapie, proposa que le système immunitaire puisse être exploité pour traiter les tumeurs via le concept de « magic bullets » qui sont des drogues qui se dirigent spécifiquement vers des cibles cellulaires structurales choisies (Strebhardt and Ullrich, 2008). Paul Ehrlich suggéra donc l'utilisation d'anticorps pour délivrer des toxines aux cellules tumorales (Strom et al., 1990). En pratique, la création de « magic bullets » sûrs et efficaces s'est révélée beaucoup plus difficile mais ces études ont permis la découverte de réponses immunitaires innée et adaptative favorisant la progression de la tumeur plutôt que son rejet ; ceci dépendant de la balance entre l'immunité pro- et anti-tumorale (Lorusso and Ruegg, 2008; Ostrand-Rosenberg, 2008). Cette polarisation en faveur du développement tumoral fut récemment expliquée par un changement dans les composants cellulaires et les médiateurs rencontrés dans le microenvironnement tumoral (Johansson et al., 2008) (Figure I.33).

a) Monocytes/Macrophages

La plupart des composants du système immunitaire sont dotés de fonctions potentielles doubles ; ils sont soit capables de rejeter les tumeurs, soit recrutés et manipulés par les cellules cancéreuses pour promouvoir leur développement (Noonan et al., 2008). Une fois recrutés sur un site tissulaire inflammatoire, les monocytes acquièrent un phénotype M1 ou M2 ; orientation basée sur les stimuli locaux. Le phénotype M1 est associé à l'inflammation et à l'activité de mort tandis que le phénotype M2 est plutôt impliqué dans le remodelage tissulaire et promeut l'angiogenèse. Ce dernier phénotype est prédominant au niveau des tumeurs (Lorusso and Ruegg, 2008). En effet, les TAMs (tumor-associated macrophages), résidents bien connus du microenvironnement tumoral, présentent généralement un phénotype M2 (production d'IL-12^{faible}/IL-10^{haut}) avec une faible capacité de présentation antigénique (Allavena et al., 2008b). Ils jouent un rôle critique dans l'organisation et le développement de la tumeur puisqu'ils favorisent la croissance tumorale (PIGF, HGF,...), le remodelage tissulaire (MMP-9,...), l'angiogenèse (VEGF, bFGF,...) et la suppression de l'immunité adaptative (IL-10) (Lorusso and Ruegg, 2008; Mantovani et al., 2008a). D'ailleurs, une corrélation positive entre le nombre de TAMs et le mauvais pronostic a été rapportée dans de nombreux cancers. L'interaction cellule tumorale-macrophage conduit au relargage de cytokines, chémokines, facteurs de croissance et de mobilité par les macrophages qui induisent le recrutement davantage de cellules inflammatoires, amplifiant ainsi l'inflammation dans le microenvironnement tumoral. Les signaux dérivés des cellules T régulatrices ou des cellules tumorales elles-mêmes (notamment M-CSF, IL-10 et TGF- β) peuvent permettre cette polarisation M2. En effet, des co-cultures de macrophages et cellules tumorales ont révélé une augmentation de la capacité d'invasion par ces dernières d'une façon dépendante de NF- κ B et du TNF- α (Mantovani et al., 2008a). Cette augmentation du potentiel invasif a notamment pu être expliquée par la sécrétion dépendant du TNF- α de MMPs par les macrophages ; suggérant la polarisation des macrophages au contact des cellules tumorales (Allavena et al., 2008a).

b) Autres cellules immunes

A l'instar des macrophages, les neutrophiles sont aussi sensibles aux signaux environnants et ajustent leur comportement, N1 ou N2, en fonction de la composition de ceux-ci (Noonan et

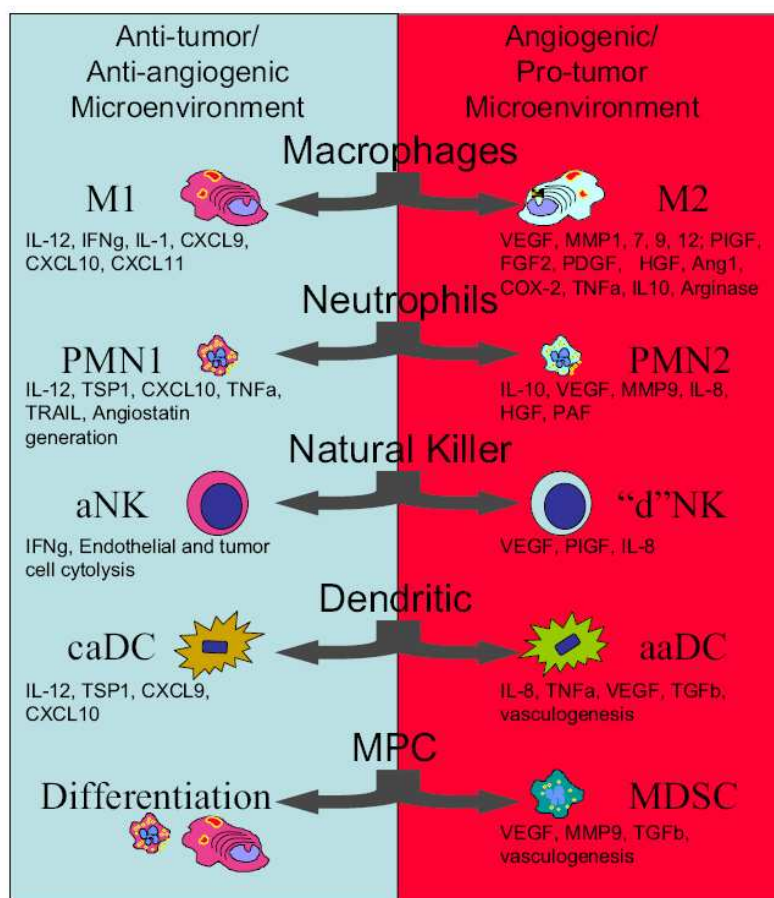


Figure I.33 : Basculement potentiel du phénotype anti-tumoral/anti-angiogénique vers un phénotype pro-tumoral/pro-angiogénique dans les sous-classes de cellules immunes (Noonan et al., 2008).

Les macrophages M2 (TAMs), les neutrophiles N2, les cellules dNK (decidual-like NK), les aaDCs (alternatively activated DC), les MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) présentent tous un phénotype contribuant à la génération d'un microenvironnement pro-tumoral et pro-angiogénique.

al., 2008). Parallèlement aux TAMs, les TANs (tumor-associated neutrophils), nouvellement identifiés, font leur entrée dans la littérature scientifique. Ils présentent une polarisation N2, comme celle induite par la stimulation au TGF- β . Ce phénotype N2 présente des propriétés pro-tumorales au contraire des neutrophiles N1 caractérisés par une expression élevée de TNF- α , ICAM-1 et FAS leur conférant une activité anti-tumorale (Lazennec and Richmond, 2010). Les cellules NK sont également capables de présenter deux phénotypes : aNK (activated) ou dNK (decidual). Les aNK possèdent des propriétés cytotoxiques vis-à-vis des cellules endothéliales et régulent négativement l'angiogenèse. Récemment identifiés, les dNK promeuvent l'angiogenèse et présentent un phénotype sécrétoire plutôt que cytotoxique. Finalement, les précurseurs myéloïdes (MPC) peuvent se différencier en cellules myéloïdes classiques ou donner lieu à des MDSCs (myeloid-derived suppressor cells) capables d'inhiber les lymphocytes T et favoriser l'angiogenèse (Noonan et al., 2008). Ces MDSCs suppriment les immunités anti-tumorales innée et adaptative en inhibant les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ et en bloquant la maturation des DCs (cellules dendritiques) (Ostrand-Rosenberg, 2008). Ces MDSCs englobent des macrophages et des granulocytes immatures ainsi que des progéniteurs de cellules dendritiques possédant une grande plasticité. Ces cellules libèrent des facteurs solubles comme la MMP-9 et le VEGF, favorisant l'angiogenèse mais sont aussi capables de se différencier directement en cellules endothéliales. Jusqu'il y a peu, les DCs étaient considérées exclusivement comme les principales cellules présentatrices d'antigènes à l'interface entre les immunités innée et acquise. Selon les conditions et leur état de maturation, ces cellules produisent une large gamme de facteurs angiogéniques ou angiostatiques. Les membres de la famille du VEGF ont été montrés pour inhiber fortement la maturation des DCs, supprimant alors leur capacité à présenter les antigènes. Ces DCs sont appelées aaDCs (alternatively activated DCs) et peuvent produire plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que l'IL-8 au contraire des DCs classiques sécrétant plutôt des facteurs anti-angiogéniques. Les aaDCs peuvent aussi se transdifférencier en cellules ressemblant à des cellules endothéliales (Noonan et al., 2008). Les lymphocytes T peuvent également présenter différents profils de cytokines les caractérisant en tant que cellules Th1 ou Th2. La réponse immune Th1 induit préférentiellement l'immunité cellulaire (avec la réponse CTL) tandis que la réponse Th2 entraîne plutôt l'immunité humorale. Plusieurs études ont dévoilé que la réponse Th1 est essentielle à l'immunité tumorale et que les cytokines Th2 diminuent cette immunité et encouragent même la croissance tumorale. Ainsi, le basculement d'un profil de cytokines Th1 à un profil Th2 est un des facteurs majeurs de l'échec de l'immunité médiée par les cellules T contre les tumeurs (Yu and Fu, 2006). En conclusion, la polarisation de l'ensemble des cellules immunes joue un rôle crucial dans le développement tumoral. Cette polarisation dépend essentiellement du microenvironnement tumoral déterminé par la présence de certains facteurs comme le TGF β orientant la réponse immunitaire vers un phénotype favorisant le développement tumoral.

3.5. Le réseau de chémokines

D'une part, la signalisation des chémokines coordonne le transport hématopoïétique des cellules souches et le recrutement des leucocytes dans le microenvironnement tumoral (Balkwill, 2004; Lazennec and Richmond, 2010) (Figure I.34).

D'autre part, le réseau de chémokines module l'expression de nombreux gènes ainsi que le dialogue entre les leucocytes et les cellules tumorales. Par exemple, l'exposition chronique des leucocytes à une forte concentration en chémokines entraîne la polarisation Th2 de la réponse immunitaire dans les tumeurs via une modification de l'expression génique. Cette polarisation aide la tumeur à détourner le système immunitaire en établissant un

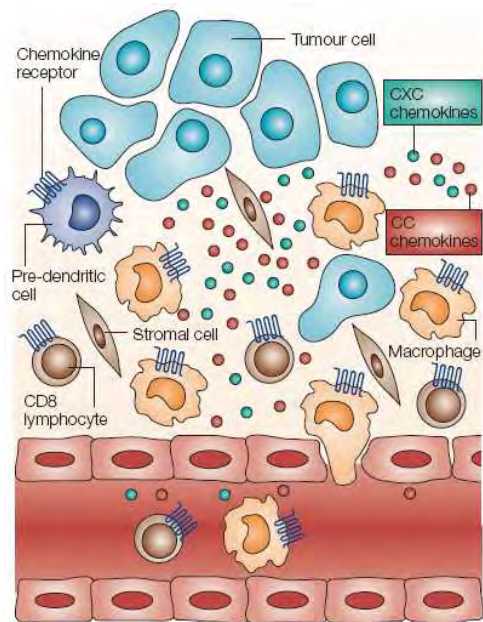


Figure I.34 : Rôles des chémokines dans l'inflammation liée au cancer (Balkwill, 2004).

Les cellules tumorales produisent des cytokines inflammatoires comme le $\text{TNF-}\alpha$ et des chémokines comme CCL2 et CXCL12 . Les leucocytes portant les récepteurs aux chémokines adéquats sont attirés vers les cellules malignes et sont stimulés pour produire eux-mêmes plus de chémokines et de cytokines inflammatoires. Les réseaux autocrines et paracrines attirent encore plus de leucocytes, et spécialement des lymphocytes Th2, des macrophages M2 et des cellules pré-dendritiques. Les leucocytes contribuent à la croissance et à la progression tumorales par la production de protéases, de facteurs angiogéniques, de facteurs de croissance et de cytokines immunosuppressives.

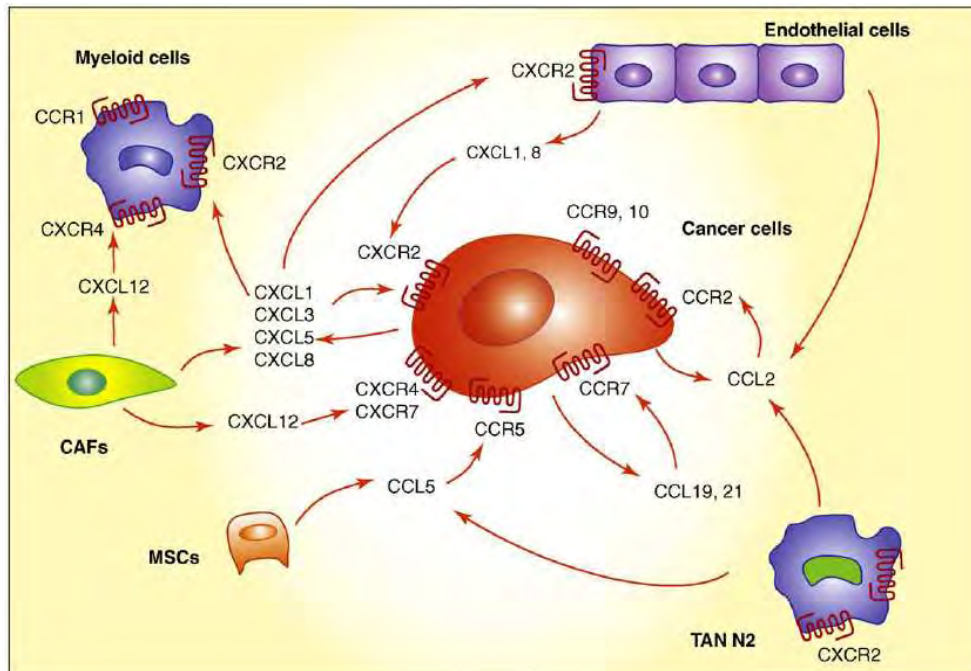


Figure I.35 : Répertoire de chémokines et de récepteurs aux chémokines exprimés dans le microenvironnement tumoral (Lazennec and Richmond, 2010).

Des interactions ont lieu entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral incluant les cellules endothéliales, les CAFs (carcinoma-associated fibroblasts), les MSCs (mesenchymal stem cells), les cellules myéloïdes et les TANs (tumor-associated neutrophils). Les cellules cancéreuses produisent une grande variété de chémokines modulant les propriétés biologiques des autres cellules. Parallèlement, les cellules du microenvironnement tumoral fournissent une source de chémokines qui peuvent modifier les fonctions des cellules cancéreuses.

microenvironnement fait de cellules immunitaires et de cytokines qui suppriment toute réponse spécifique anti-cancéreuse comme expliqué ci-dessus (Balkwill, 2004). Les chémokines promeuvent aussi la croissance tumorale via un mécanisme d'action direct sur les cellules tumorales elles-mêmes, requérant l'expression fonctionnelle de récepteurs aux chémokines sur les cellules malignes (Rollins, 2006). Ainsi, les cellules cancéreuses produisent une grande variété de chémokines modulant leurs propriétés mais aussi celles des cellules stromales associées (Lazennec and Richmond, 2010) (Figures I.34 et I.35).

3.6. *Inflammation et cancer : amis ou ennemis ?*

A ce stade, nous pouvons conclure que, même si théoriquement le système immunitaire est capable de rejeter la tumeur, en réalité, ses composants sont détournés par les cellules cancéreuses pour favoriser leur croissance et leur invasion. Une intégration générale des concepts abordés précédemment va donc permettre d'analyser l'importance de l'inflammation dans la progression tumorale.

La relation entre la surveillance du système immunitaire et le cancer est très dynamique. La surveillance immunitaire peut contrôler ou éliminer certaines lésions pré-malignes et des cancers précoces. De nos jours, la réponse anti-tumorale des cellules T est considérée comme le mécanisme principal de l'immunité tumorale. Celle-ci est causée par une mort directe des cellules tumorales par des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) reconnaissant le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I avec les antigènes exprimés sur la surface des cellules tumorales (Lorusso and Ruegg, 2008). Cependant, avec le temps, les cellules tumorales sous la pression de sélection induite par la surveillance immunitaire peuvent subir un processus appelé « immunoediting » constitué de trois phases : élimination, équilibre, échappement. Les cellules tumorales résistantes à la phase d'élimination développent alors un phénotype capable de manipuler les cellules immunitaires via la sécrétion de chémokines et de cytokines. Les TAMs et les lymphocytes B ainsi éduqués produisent des facteurs participant au remodelage tissulaire, à l'angiogenèse et à la suppression de l'immunité (Mantovani et al., 2008b). De plus, la différenciation et l'activation des cellules dendritiques représentant des initiateurs clés des réponses adaptatives sont inhibées par des signaux, comme l'IL-10, présents dans le microenvironnement tumoral. De surcroît, les tumeurs sont fréquemment infiltrées par des cellules T régulatrices, supprimant toute réponse innée et adaptative (Lorusso and Ruegg, 2008). Dès lors, dans l'inflammation liée au cancer, de multiples mécanismes suppriment l'immunité anti-tumorale : diminution ou perte des antigènes associés à la tumeur considéré comme le mécanisme principal de l'échappement à la réponse CTL et relargage de cytokines immunosuppressives, comme le TGF- β , affectant la prolifération, l'activation et la différenciation de cellules immunitaires effectrices (Lorusso and Ruegg, 2008; Mantovani et al., 2008a). Pourtant, dans certaines tumeurs, la présence de cellules inflammatoires est associée à un meilleur pronostic, reflétant la capacité des cellules inflammatoires à détruire les cellules tumorales. En effet, des macrophages activés de manière appropriée peuvent tuer les cellules tumorales et enclencher des réponses inflammatoires destructrices centrées sur les vaisseaux sanguins, même si dans la plupart des cas, leurs propriétés pro-tumorales l'emportent (Mantovani et al., 2008a). Plusieurs études ont montré le rôle déterminant de NF- κ B dans la balance entre les propriétés pro- et anti-tumorales des macrophages (Hagemann et al., 2008; Saccani et al., 2006). Hagemann et al. ont en effet montré que les macrophages sont polarisés vers un phénotype immunosuppressif M2 grâce à l'activation de NF- κ B en aval de l'IL-1R et du TLR. Lorsque la signalisation de NF- κ B est inhibée dans les TAMs (via l'inhibition de IKK β), ceux-ci deviennent cytotoxiques pour les cellules tumorales et retournent à une polarisation classique M1. Ils ont aussi montré que le

ciblage de NF- κ B dans les TAMs favorise la régression des tumeurs avancées *in vivo* par l'induction de macrophages possédant une activité tumoricide et par l'induction d'une activité anti-tumorale via le recrutement de cellules NK dépendant de l'IL-12. Ainsi, l'inhibition de l'activité de IKK β spécifiquement dans les TAMs est capable de modifier leur phénotype et de les rééduquer pour tuer activement les cellules tumorales par leur action directe tumoricide grâce la production de NO et par la promotion de l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules NK (Hagemann et al., 2008; Mantovani et al., 2008a).

En conclusion, la connaissance du microenvironnement tumoral permet une meilleure compréhension de la biologie cancéreuse nécessaire à la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques (Albini and Sporn, 2007). Les cellules inflammatoires influençant la tumeur et son microenvironnement ont de puissants effets sur le développement tumoral en agissant comme promoteurs tumoraux, produisant un environnement attractif pour la croissance tumorale, facilitant l'instabilité génomique, et favorisant l'angiogenèse. L'efficacité de la thérapie anti-inflammatoire vis-à-vis de la progression néoplasique et de la conversion maligne a déjà été soulignée (Coussens and Werb, 2002). En effet, plusieurs données indiquent que l'utilisation de NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) tels que l'aspirine peut avoir de puissants effets anti-métastases (Mamytbekova et al., 1986) ou encore peut inhiber la carcinogenèse du colon comme montré par Elder et al. (Coussens and Werb, 2002; Elder et al., 1997). L'utilisation de ces drogues a aussi été montrée pour réduire de 40 à 50% les risques de cancer du colon et pour avoir un effet préventif pour les cancers du poumon, de l'œsophage et de l'estomac via notamment leur activité d'inhibition des COX-1 et -2. D'autres mécanismes d'action des NSAIDs ont également été proposés comme l'induction de l'apoptose des cellules tumorales via le relargage du cytochrome c de la mitochondrie, l'interférence avec le cycle cellulaire ou la stimulation de la surveillance immunitaire (Coussens and Werb, 2002).

4) TNF- α : tumor necrosis factor ou tumor promoting factor ?

4.1. Généralités

En 1975, Carswell et al. étudièrent la nécrose hémorragique des tumeurs de souris infectées par la bacille de Calmette-Guérin, bactérie libérant une endotoxine responsable de cette nécrose. Ils se sont aperçus que les endotoxines agissaient indirectement via la libération par l'hôte d'une substance qu'ils ont alors surnommée TNF pour « tumor necrosis factor » et qui semblait sélectivement toxique pour les cellules malignes humaines et murines. Suite à ces observations, ils ont alors proposé que le TNF- α soit responsable de l'élimination des cellules transformées par les macrophages (Carswell et al., 1975). Durant les quinze années suivant sa découverte, de nombreux articles ont identifié plusieurs protéines lui étant associées possédant des rôles opposés dans la mort cellulaire, la survie et l'organogenèse. Ces rôles opposés sont maintenant justifiés par plusieurs voies de signalisation intracellulaire en aval de la liaison du TNF- α à son récepteur pouvant conduire soit à la mort cellulaire, soit à la survie et à l'inflammation ; ceci dépendant essentiellement du contexte cellulaire (Balkwill, 2009). Ces voies seront détaillées par après (voir point 4.2).

L'espoir que le TNF- α puisse être utilisé comme une cytokine anti-cancéreuse puissante s'effondra après la découverte de l'induction d'un choc systémique et de réponses inflammatoires trop puissantes par la cytokine recombinante ; lui faisant alors perdre sa valeur thérapeutique (Balkwill, 2009; Wang and Lin, 2008). En plus de ses effets délétères,

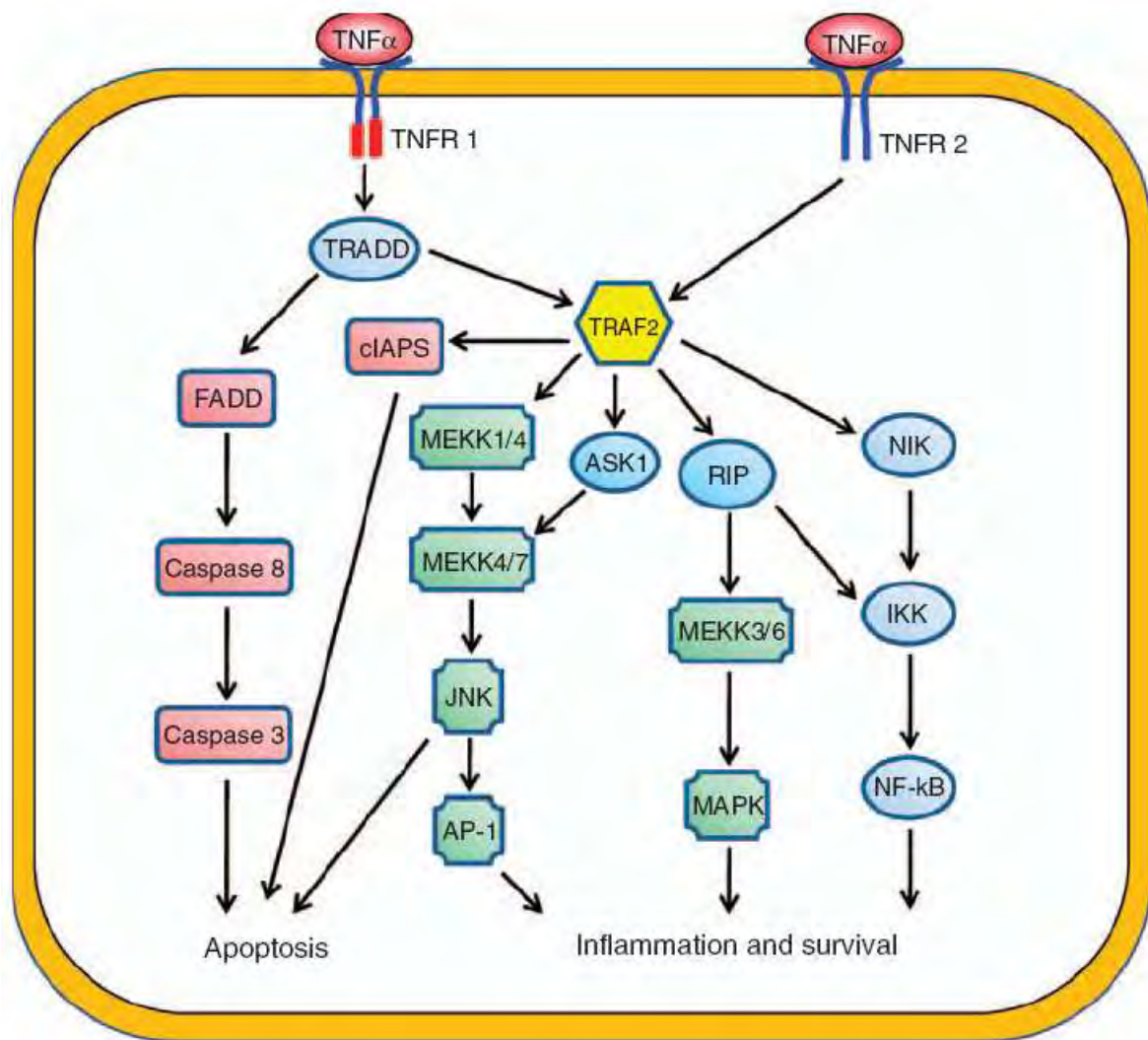


Figure I.36 : Voies de signalisation en aval du TNF- α (Wu and Zhou, 2010).

Le TNF- α peut activer différentes voies induisant l'apoptose, la survie cellulaire ou l'inflammation. Il induit l'apoptose par la liaison de la caspase 8 à FADD et il promeut l'inflammation et la survie par la voie dépendante de TRAF2 via la cascade de kinases dépendante de la JNK, la cascade de kinases à partir de MEK et l'activation de NF- κ B.

FADD, Fas-associated via death domain; MKK, MAPK kinase; RIP, receptor-interacting protein; TRADD, TNFR-associated via death domain; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2.

beaucoup de cellules cancéreuses sont résistantes à la cytotoxicité induite par le TNF- α (Wang and Lin, 2008). Par la suite, l'observation de sa production constitutive au sein du microenvironnement tumoral dans de nombreuses tumeurs malignes le qualifia de médiateur majeur de l'inflammation liée au cancer et de mauvais pronostic pour l'issue du traitement (Wu and Zhou, 2009). L'expression du TNF- α au niveau ARNm et au niveau protéique a en effet été détectée dans des cellules stromales et malignes de biopsies cancéreuses humaines (Beissert et al., 1989; Naylor et al., 1993). Ainsi, sa présence dans le microenvironnement tumoral est constitutive et sa quantité s'élève à plusieurs picogrammes (Balkwill, 2006). De plus, le niveau de TNF- α plasmatique est augmenté chez certains patients cancéreux dont essentiellement ceux présentant un mauvais pronostic (Ferrajoli et al., 2002; Karayiannakis et al., 2001; Yoshida et al., 2002). Une explication de la production constitutive du TNF- α par les cellules malignes est basée sur l'augmentation de la stabilité de son ARNm ou de sa traduction pouvant découler d'altérations génétiques. En effet, les données récentes ont montré que les voies de signalisation de l'inflammation sont en aval de voies sujettes à des mutations oncogéniques (Balkwill, 2009). Le premier exemple a été publié en 2003 montrant que pVHL, suppresseur de tumeur muté et donc non fonctionnel dans une grande proportion des cancers, réprime la traduction du TNF- α via sa capacité à s'associer aux polysomes et à interagir avec des régulateurs de la traduction (Galban et al., 2003). La mutation du pVHL conduit donc à une augmentation de la synthèse du TNF- α .

Ainsi, qu'il soit considéré comme pro- ou anti-tumoral, le TNF- α est essentiel à la biologie cancéreuse et sa prise en compte au 21^{ème} siècle est indispensable dans la conception de traitements anti-cancéreux innovants. En plus de son importance dans le microenvironnement tumoral, le TNF- α constitue un facteur majeur de toute inflammation chronique de manière générale. Le développement d'antagonistes de son action a d'ailleurs révolutionné le traitement de l'arthrite rhumatoïde et d'autres maladies inflammatoires (Balkwill, 2009).

4.2. Signalisation intracellulaire du TNF- α à l'origine de ses deux rôles opposés

Les gènes codant pour le TNF- α et ses deux récepteurs principaux, TNFR1 et TNFR2, furent clonés en 1984 et en 1990 respectivement, ce qui permit le développement d'outils de recherche comme des souris KO (Balkwill, 2009). Les récepteurs du TNF- α peuvent être classés en trois groupes. Le premier groupe de récepteurs, TNFR1, contient un domaine de mort (DD) dans leur partie cytoplasmique qui peut recruter FADD (Fas-associated death domain) et TRADD (TNFR1-associated death domain) formant le complexe DISC (death inducing signaling complex) conduisant à l'activation de la cascade des caspases et donc à l'induction de l'apoptose. Il peut aussi recruter TRAF (TNF receptor-associated factor) qui favorise plutôt la survie et l'inflammation. Le deuxième groupe de récepteurs, TNFR2, contient un motif TIM (TRAF-interacting motif) dans sa partie cytoplasmique. L'activation du TNFR2 conduit au recrutement de TRAF qui active de multiples médiateurs des voies de transduction du signal comme MAPK, ERK, p38, IKK et PI3K (Figure I.36). Le troisième groupe de récepteurs, TNFR3, ne contient pas de domaine ou motif de signalisation fonctionnel. Ainsi, TNFR3 ne fournit pas de signalisation intracellulaire mais peut entrer en compétition avec les deux autres récepteurs pour leurs ligands (Mocellin et al., 2005).

TNFR1 est exprimé en surface de tous les types cellulaires tandis que le TNFR2 est exprimé uniquement sur les cellules endothéliales et les cellules immunes. Le TNF- α présente un potentiel de signalisation aussi bien sous forme transmembranaire (26 kDa) que sous forme soluble (17 kDa) relarguée après clivage protéolytique via la TACE (TNF- α -converting enzyme), aussi appelée ADAM17 (Wu and Zhou, 2010). TNFR1 est activé par le ligand

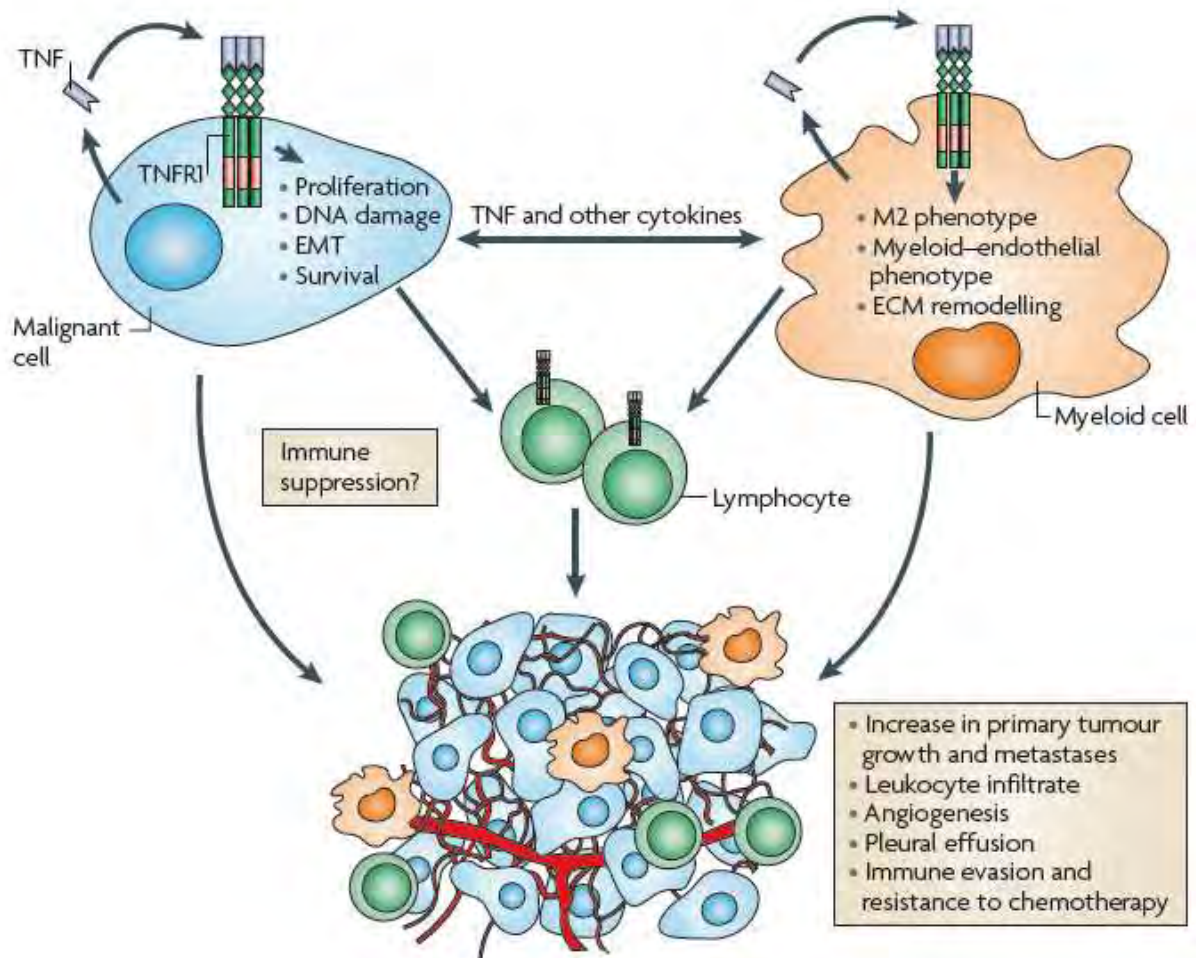


Figure I.37 : Actions pro-tumorales du TNF- α dans le microenvironnement tumoral (Balkwill, 2009).

Le TNF- α , produit par les cellules malignes, les cellules myéloïdes et d'autres cellules du microenvironnement tumoral, agit essentiellement via le TNFR1 de façon autocrine et paracrine. Les actions autocrines incluent la création de dommages génétiques dans les cellules malignes, l'augmentation de la survie de ces cellules et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Le TNF- α induit aussi sa propre expression ainsi que l'augmentation de la production de cytokines, chémokines et récepteurs aux chemokines sur les cellules malignes. Les cytokines et chémokines agissent sur, et sont en échange produites par, les cellules myéloïdes du microenvironnement tumoral et contribuent au maintien du phénotype pro-tumoral (M2 pour les macrophages) de ces cellules. Ce phénotype stimule le remodelage de la MEC et initie la différenciation des cellules progénitrices endothéliales, contribuant à l'angiogénèse. Les actions du TNF- α et des cytokines qui lui sont associées agissent aussi sur les lymphocytes menant à une immunosuppression locale. Le résultat final de toutes ces actions consiste à augmenter la croissance de la tumeur primaire, à l'aider à la dispersion métastatique, à réguler le phénotype des leucocytes infiltrés et l'angiogénèse. Le TNF- α est aussi impliqué dans la résistance à la chimiothérapie.

soluble et TNFR2 lie préférentiellement le TNF- α transmembranaire. Au contraire de TNFR1, TNFR2 ne possède pas de DD. Le rôle biologique du TNFR2 n'est pas encore complètement compris. De récentes observations suggèrent que le TNFR2 puisse moduler l'action du TNFR1 dans les cellules endothéliales et les cellules immunes. Le TNF- α transmembranaire peut fonctionner comme un ligand ou comme un récepteur, dans le cas où des récepteurs solubles du TNF- α viennent se lier à la cytokine en surface cellulaire et générer une signalisation inverse (Balkwill, 2009).

L'étape initiale de la signalisation du TNFR1 implique la liaison de l'homotrimère TNF- α au domaine extracellulaire du récepteur, ce qui induit sa trimérisation et le relargage de SODD (silencer of death domain), une protéine inhibitrice se liant au DD (death domain) du TNFR1 et réprimant sa signalisation spontanée. Après le relargage de SODD, TRADD peut venir se lier au DD du TNFR1 et recruter des protéines adaptatrices additionnelles comme RIP (receptor-interacting protein), TRAF2 et FADD, qui sont à l'origine de différentes cascades signalétiques (Mocellin et al., 2005). TRADD recrute TRAF2 qui active IKK (I κ B kinase) via RIP. RIP1 est en fait ubiquitinée de manière dépendante de TRAF2 pendant l'activation du TNFR1, ce qui est essentiel à l'induction de IKK menant à l'activation de NF- κ B (Wu and Zhou, 2010). Ainsi, la liaison du ligand au TNFR1 conduit à l'activation d'AP1 ou d'IKK menant à l'activation de NF- κ B. L'activation de NF- κ B induit des régulateurs négatifs de l'apoptose comme FLIPL, Bcl-2 et la superoxyde dismutase. Si l'activation de NF- κ B est inadéquate, l'apoptose est médiée via la caspase-8 (aussi appelée FLICE pour FADD-like IL-1 converting enzyme-like (Mocellin et al., 2005)) et via l'accumulation intracellulaire de ROS, l'activation continue de la JNK et les voies mitochondriales. Ainsi, l'apoptose est une réponse tardive au TNF- α , au contraire de l'apoptose rapide induite par les autres ligands de mort comme FASL et TRAIL (Balkwill, 2009). La caspase-8 s'auto-active pour déclencher l'activation des caspases -3 et -7 effectrices et les endonucléases menant à la destruction des composants protéiques cellulaires, à la fragmentation de l'ADN et à la mort cellulaire par apoptose. Cette voie est appelée la voie apoptotique extrinsèque. Le TNF- α peut aussi induire l'apoptose via la voie intrinsèque faisant intervenir la mitochondrie. Elle s'accomplit via l'activation de Bid (Bcl-2-interacting domain), un membre de la famille des BH3-only, par la caspase-8. En fait, le clivage de Bid par la caspase-8 génère tBid, qui migre à la mitochondrie et lui fait perdre son potentiel de membrane conduisant au relargage du cytochrome c et de Smac (second mitochondria-derived activator of caspase)/DIABLO (direct IAP binding protein with low pI) dans le cytosol. Le cytochrome c se lie à Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) et à la pro-caspase-9 pour former l'apoptosome, menant à l'activation des caspases effectrices médiée par la caspase-9. Smac se lie et inhibe les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs), ce qui accélère l'apoptose. En plus de l'apoptose, le TNF- α peut aussi induire la mort cellulaire par nécrose, indépendante de l'activité des caspases (Wang and Lin, 2008).

Physiologiquement, les vaisseaux sanguins sont parmi les premières cibles du TNF- α pendant l'inflammation. L'effet majeur du TNF- α sur l'endothélium semble consister en l'activation des cellules endothéliales incluant la surexpression des récepteurs de surface comme les molécules d'adhérence et la perte de l'adhérence intercellulaire. Ces événements augmentent l'adhérence des leucocytes et mènent à leur migration dans des régions d'inflammation (Mocellin et al., 2005). En conclusion, le TNF- α peut directement faciliter le développement du cancer en régulant la prolifération et la survie des cellules transformées et peut aussi exercer ses effets sur les cellules endothéliales et les autres cellules du microenvironnement tumoral (Wu and Zhou, 2010) (récapitulatif des actions pro-tumorales du TNF- α à la Figure 37).

Objectifs

Le pourcentage de personnes souffrant du cancer ne cesse de s'accroître ; le pourcentage de guérison aussi. Cependant, près de la moitié des cancers conduit toujours à la mort du patient. En effet, dans certains types de cancers tels que ceux du pancréas et du poumon, les traitements habituels ne suffisent pas.

La progression d'une tumeur est dans un premier temps dépendante de la capacité proliférative des cellules transformées. Par la suite, pour pouvoir dépasser une taille de 1 mm³, la croissance de la tumeur est essentiellement modulée par sa capacité d'initier l'angiogenèse. Le réseau vasculaire représente donc une composante majeure du devenir des tumeurs, plaçant les cellules endothéliales au centre de nouvelles recherches. Les thérapies anti-angiogéniques ont alors déclenché à elles seules un mouvement d'espoir pour la guérison définitive de tous les cancers. Ces nouvelles molécules, parfois utilisées en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques, sont efficaces mais pas suffisamment que pour contourner l'agressivité de certaines tumeurs capables de maintenir leur angiogenèse par le biais de voies alternatives. Les études portées sur le réseau vasculaire tumoral ont cependant permis de mettre en lumière l'existence d'une hypoxie dite intermittente générée par un flux sanguin irrégulier et touchant aussi bien les cellules tumorales que les cellules endothéliales. La recherche des effets de l'hypoxie intermittente sur ce dernier type cellulaire a montré que l'hypoxie intermittente peut induire une augmentation de leur résistance vis-à-vis de la radiothérapie, ainsi qu'une augmentation de leur comportement migratoire et de leur capacité à s'associer en structures tubulaires. Outre leur exposition à une hypoxie intermittente, les cellules endothéliales « baignent » littéralement dans un environnement inflammatoire, autre caractéristique typique du microenvironnement tumoral. Les effets combinés de l'hypoxie intermittente et de l'inflammation sur les cellules endothéliales n'ont à ce jour pas encore été étudiés.

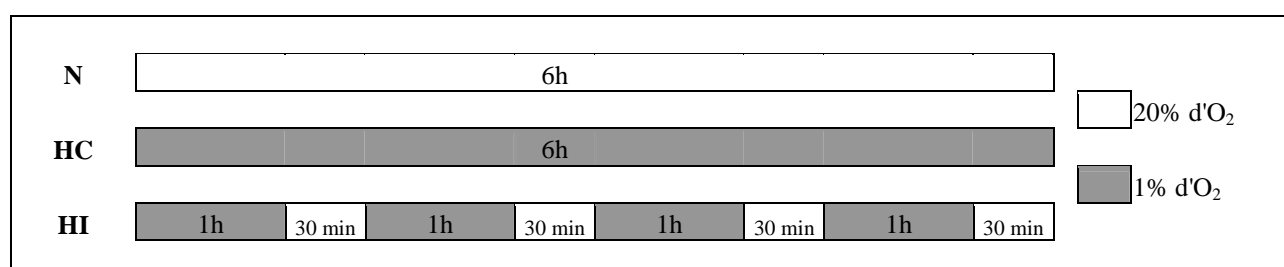
En conséquence, ce mémoire a pour objectif de comprendre les effets de l'hypoxie intermittente combinée à un environnement inflammatoire sur l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique dans les cellules endothéliales. L'hypoxie intermittente a été « mimée » par des cycles répétés d'hypoxie et de réoxygénation tandis que l'inflammation a été stimulée par une incubation des cellules endothéliales avec du TNF- α .

Trois approches ont été menées en parallèle afin de suivre l'effet de l'hypoxie intermittente combinée à un microenvironnement inflammatoire sur les cellules endothéliales. La première a été de suivre l'expression de plusieurs gènes de différentes classes connus pour être impliqués dans l'inflammation et/ou l'angiogenèse. Les variations d'expression en ARNm ont été suivies par RT-PCR quantitative. Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'expression protéique de certains gènes présentant des variations en ARNm intéressantes. Sachant que l'angiogenèse nécessite la migration des cellules endothéliales, la deuxième approche a été d'évaluer la présence d'enzymes sécrétées dans le milieu d'incubation, enzymes capables de dégrader la MEC. L'activité de ces enzymes a été étudiée en zymographie. Une troisième approche menée par une étude fonctionnelle a également été réalisée pour évaluer la capacité de migration des cellules endothéliales après une incubation en hypoxie intermittente et/ou en présence de TNF- α .

Les résultats de ces expériences permettront de mieux comprendre les effets de l'hypoxie intermittente et du microenvironnement inflammatoire sur les cellules endothéliales tumorales. Cette meilleure compréhension de leur comportement est nécessaire à la conception de nouvelles stratégies ciblant au mieux l'angiogenèse tumorale.

Tableau II.1 : Culture cellulaire – Matériel

Boîtes de culture de 75 cm ² (T75 ; Costar, Corning, USA)	
Milieu de culture complet	Milieu DHG-L1 : DMEM (Dulbelcco's modified eagle medium : GIBCO, UK) supplémenté avec 18 mM de NaHCO ₃ (Merck, Germany) 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO, UK)
PBS (Phosphate Buffer Saline) stérile (BioWhittaker, Lonza, Belgium)	Tampon phosphate 10 mM pH 7,4 150 mM NaCl
Trypsine-EDTA	Solution de trypsine (0,5 g/l) et EDTA (0,2 g/l) (GIBCO, UK)
Tubes de 10 ml (Sterilin, UK)	
Centrifugeuse (Centrifuge 5702, Eppendorf, Germany)	

**Figure II.1** : Incubation en normoxie (N), hypoxie chronique (HC) et hypoxie intermittente (HI).**Tableau II.2** : Incubation – Matériel

Milieu CO ₂ -indépendant sans sérum (GIBCO, UK)
L-glutamine : 0,5 mM (36 mg/500 ml de milieu) (Sigma, USA)
TNF- α recombinant humain : 0,1 ng/ml (concentration stock de 10 μ g/ml) (R&D Systems, USA)

1) Culture cellulaire

Les cellules endothéliales EAhy926 sont issues d'une fusion entre des HUVECs et des A549 (voir « Modèle d'étude » dans la partie « Résultats »). Elles nous ont été généreusement données par Cora-Jean Edgell (Edgell et al., 1983). Ces cellules sont cultivées dans des boîtes de culture en polystyrène de 75 cm² (T75) et conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Elles sont maintenues dans du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum de veau fœtal. Elles sont repiquées tous les deux jours sauf le week-end (trois jours) selon le protocole suivant. Le milieu de culture est décanté et chaque T75 est rincée deux fois avec 5 ml de PBS stérile afin d'enlever toute trace de sérum. Une fois le PBS retiré, les cellules sont détachées par ajout de 1,5 ml de trypsine-EDTA. En effet, la trypsine, en tant qu'endoprotéase, catalyse des clivages protéolytiques tandis que l'EDTA, puissant chélateur d'ions cationiques, empêche les liaisons intercellulaires (cadhérines) et l'adhérence au support (intégrines) nécessitant, toutes deux, du calcium. Pour permettre l'activité de la trypsine, la T75 est incubée 2 minutes à 37°C dans une étuve sèche. Lorsque les cellules sont détachées, 5 ml de milieu complet sont ajoutés pour inactiver la trypsine grâce aux inhibiteurs de protéases contenus dans le sérum. L'ensemble de la suspension cellulaire est alors récupéré dans un tube de 10 ml stérile et centrifugé 5 minutes à 1000 rpm pour culoter les cellules. Après la centrifugation, le surnageant est décanté et le culot de cellules resuspendu à l'aide de 4 ml de milieu ou 6 ml pour le week-end. La suspension cellulaire est répartie dans deux nouvelles T75 (ou trois pour le week-end) de manière à diluer deux (ou trois) fois l'ensemble des cellules obtenues par trypsinisation d'une T75. Du milieu frais est rajouté dans chaque T75 pour atteindre un volume final de 15 ml en semaine et de 17 ml pour le week-end. Les boîtes sont placées dans l'étuve humide en veillant à garder leur bouchon semi-ouvert pour favoriser les échanges de CO₂ (Tableau II.1).

2) Incubation en hypoxie et en présence de TNF- α

Le milieu de culture est décanté et remplacé par du milieu CO₂-indépendant sans sérum et supplémenté par 0,5 mM de L-glutamine. Les cellules sont soit incubées en normoxie (N) dans une atmosphère normale contenant 20% d'O₂ ou soit incubées en hypoxie dans une atmosphère contenant 99% d'N₂ et 1% d'O₂. Deux types d'hypoxie sont réalisées : une hypoxie chronique (HC) et une hypoxie intermittente (HI). En HC, les cellules sont incubées durant une période de 6h à 1% d'O₂ tandis qu'en HI, les cellules sont exposées, pendant une période de 6h, à quatre cycles consécutifs d'1h d'hypoxie (1% d'O₂) suivie de 30 minutes de réoxygénation (20% d'O₂). En N, les cellules sont incubées pendant une période continue de 6h à 20% d'O₂ (Figure II.1). En plus d'être incubées en N, HC, ou HI, les cellules EAhy926 sont incubées ou non en présence de TNF- α à une concentration finale de 0,1 ng/ml (Tableau II.2).

3) RT-qPCR (Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction)

3.1. Principe

La PCR en temps réel permet de quantifier l'abondance d'ARNm et ainsi de comparer parmi différentes conditions le niveau d'expression de gènes d'intérêt. Cette technique se base sur l'amplification d'une petite quantité d'ADNc, obtenue par rétro-transcription d'ARN totaux, grâce à la présence d'une polymérase, d'amorces et de nucléotides. L'augmentation de la quantité d'ADNc est suivie tout au long de la réaction, qualifiant la technique de PCR en « temps réel ». Cette amplification est au début exponentielle suite à la présence des réactifs en excès, et atteint ensuite un plateau résultant de la compétition entre la renaturation des

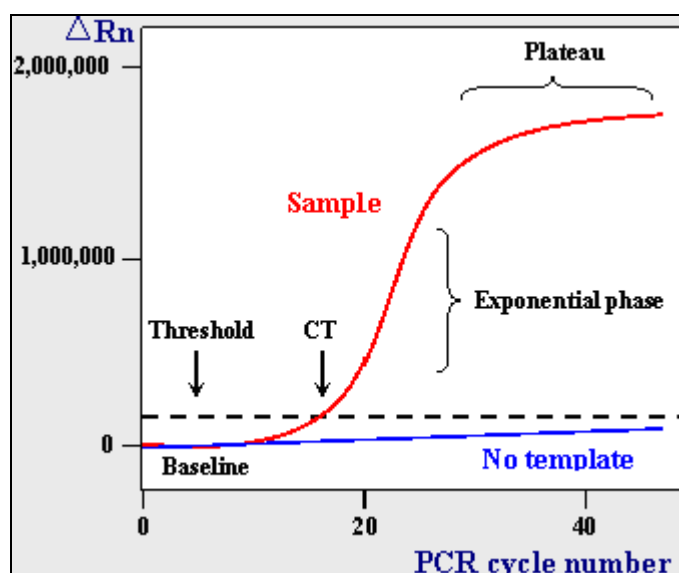


Figure II.2 : Mesure de la fluorescence (ΔR_n) au cours des cycles d'amplification d'une réaction de PCR en temps réel.

NCBI, "Real-Time qRT-PCR", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>

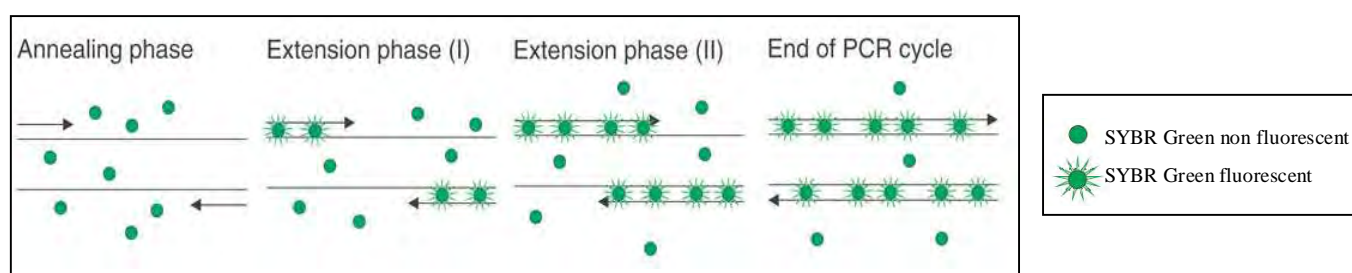


Figure II.3 : Mécanisme d'action du SYBR Green (van der Velden, Hochhaus et al. 2003)

La fluorescence du SYBR Green est fortement augmentée lors de sa liaison à un double brin d'ADN. Pendant la phase d'élongation, de plus en plus de molécules de SYBR Green se lient au produit PCR, résultant en une augmentation de la fluorescence. Ainsi, à chaque cycle PCR, le signal fluorescent est de plus en plus détecté mais est absent lors de la phase de dénaturation.

Tableau II.3 : Extraction ARN – Matériel

<u>Extraction ARN manuelle</u>	<u>Extraction ARN avec le QIAcube</u>
Boîtes de culture de 25 cm ² (T25 ; Costar, Corning, USA)	
Racloirs (SPL Life Sciences, Korea)	
RNeasy Mini Kit (#74104, QIAGEN, The Netherlands)	RNeasy Mini Kit + QIAcube (QIAGEN, The Netherlands)
Ethanol (Merck, Germany) 70%	
Eppendorfs de 1,5 ml (Sarstedt, Germany)	Eppendorfs de 1,5 ml et de 2 ml QIAcube (QIAGEN, The Netherlands) Adaptateurs pour le rotor (QIAGEN, The Netherlands)
Centrifugeuse (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany)	
Nanodrop Spectrophotometer (ND-100, Isogen Life Science, The Netherlands)	

simples brins d'ADN et la liaison des amorces aux simples brins. La quantité d'ADN est mesurée par la fluorescence émise par la molécule SYBR Green se liant aux doubles brins d'ADN (Figure II.2). C'est dans la partie linéaire de la phase exponentielle que la quantification de l'ADNc est réalisée. Une valeur seuil est établie et le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la fluorescence dépasse ce seuil correspond à la valeur Ct (Cycle threshold) (Figure II.3) (van der Velden et al., 2003). Cette valeur Ct est donc inversement proportionnelle à l'abondance de l'ADNc et ainsi à l'abondance de l'ARNm du gène d'intérêt.

3.2. Méthode

a) Extraction d'ARN avec le kit QIAGEN ou avec le système QIAcube

Les cellules EAhy926 sont repiquées à une densité de 2.10^6 cellules par T25. 20h après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par 5 ml de milieu CO₂-indépendant supplémenté en L-glutamine et les cellules sont incubées en N, HC, HI avec ou sans TNF- α . Après l'incubation, le milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 5 ml de PBS, qui sont ensuite complètement décantés. 350 μ l de RLT Buffer Lysis du kit d'extraction ARN « Qiagen RNeasy Mini Kit » sont ajoutés et les cellules sont raclées dans ce tampon de lyse. Les lysats cellulaires sont alors récoltés dans des eppendorfs (si extraction manuelle avec le kit) ou dans des tubes de 2 ml spéciaux (si extraction avec le QIAcube), vortexés et conservés à -70°C avant d'effectuer l'extraction ARN (Tableau II.3).

➤ **Extraction manuelle avec le kit QIAGEN**

Les lysats cellulaires sont dégelés à température ambiante et vortexés. 350 μ l d'éthanol 70% sont ajoutés dans chaque eppendorf et les échantillons sont alors mélangés par inversion. Le mélange lysat/éthanol est ensuite déposé sur une colonne placée dans un tube de 2 ml et centrifugé 30 secondes à 10 000 rpm à température ambiante. L'éluat dans le tube de 2 ml est alors décanté et 700 μ l de Buffer RW1 sont ajoutés sur chaque colonne. Les colonnes sont ensuite centrifugées 30 secondes à 11 000 rpm à température ambiante. L'éluat est décanté, 500 μ l de buffer RPE sont ajoutés sur chaque colonne, qui sont ensuite centrifugées 30 secondes à 11 000 rpm. L'éluat est décanté et 500 μ l de buffer RPE sont de nouveau ajoutés à chaque colonne. Les colonnes sont ensuite centrifugées 2 minutes à 11 000 rpm. Elles sont placées dans de nouveaux tubes de 2 ml et centrifugées 1 minute à 13 200 rpm. Ces dernières sont récupérées, placées dans de nouveaux eppendorfs (1,5 ml) et l'ARN est élué en ajoutant 30 μ l d'eau RNase-free et en centrifugeant 1 minute à 11 000 rpm. Les colonnes sont alors jetées et les eppendorfs contenant l'ARN conservés à -70°C. Avant la congélation, un dosage de la concentration en ARN est réalisé grâce à un spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 260 nm. L'absorbance est également mesurée à 230 et 280 nm pour s'assurer que les concentrations en protéines ($\text{abs } 260/\text{abs } 280 > 1,5$) et en sels ($\text{abs } 260/\text{abs } 230 > 2$) ne sont pas trop élevées.

➤ **Extraction avec le système QIAcube**

Les lysats cellulaires sont dégelés à température ambiante, vortexés et la machine QIAcube est préparée. Il faut tout d'abord vérifier que le shaker utilisé soit bien le numéro 2. Il faut ensuite placer des tips spéciaux à l'endroit prévu à cet effet et préparer les adaptateurs pour la centrifugation. Ces adaptateurs contiennent des colonnes et des tubes de 1,5 ml servant à récolter l'ARN en fin d'extraction. Ces adaptateurs sont ensuite positionnés correctement selon un ordre précis sur le rotor et les tubes de 2 ml contenant les lysats sont placés sur le shaker selon le même ordre que les adaptateurs. L'eau RNase-free, l'éthanol 70%, le buffer RW1 et le buffer RPE sont déposés et la machine peut être programmée. Le mode RNeasy Mini Kit Standard est choisi et le volume d'élution est de 50 μ l. Le QIAcube est alors fermé et l'extraction est lancée (+/- 30 minutes ; 12 échantillons maximum par run). Les tubes de 1,5

Tableau II.4 : Rétro-transcription – Matériel

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Germany)
Blocs chauffants (Techne Dri-Block DB 2D, UK)

Tableau II.5 : PCR en temps réel – Matériel

SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)		
Fast Start Universal SYBRGreen Master (Roche, USA)		
Amorces forward (F) et reverse (R) (Applied Biosystems, AB, Life Technologies, USA)		
Amorces forward (F) et reverse (R) (IDT ; Belgium)		
Plaque 96 puits (Optical 96 well reaction plate, Applied Biosystems, Life Technologies, USA)		
Machine Real-time PCR : 7900HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, Life Technologies, USA)		
RPL13 (23 kDa, IDT)	F	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG
	R	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT
APOJ (AB)	F	GGATGAAGGACCAGTGTGACAAG
	R	CAGCGACCTGGAGGGATTC
bFGF (AB)	F	TTCAAAGTTCATTTAAAGGCTACTATTCAT
	R	TGGATACGACTAATATTGTTGTGGAA
ICAM-1 (AB)	F	GGAGCTTCGTGTCCTGTATGG
	R	ACATTGGAGTCTGCTGGGAATT
IL-1 β (AB)	F	CTTAAAGCCCGCCTGACAGA
	R	AATAGGGAAGCGGTTGCTCAT
IL-6 (AB)	F	TGGCTGCAGGACATGACAA
	R	CCATGCTACATTTGCCGAAGA
IL-8 (AB)	F	TTGATACTCCAGTCTTGTTCATTGC
	R	TGACTGTGGAGTTTTGGCTGTTT
MCP-1 (AB)	F	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG
	R	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTT
MMP-1 (AB)	F	CATGCGCACAAATCCCTTCTA
	R	GAACAGCCCAGTACTTATTCCTTT
MMP-2 (IDT)	F	ATCGCAGATGCCTGGAATG
	R	CTTTGGTTCTCCAGCTTCAGGTAAT
MMP-9 (IDT)	F	CCTTCCTTATCGCCGACAAGT
	R	ACCGACGCGCCTGTGTAC
MMP-14 (AB)	F	TGCCTGCGTCCATCAACA
	R	ACACCCAATGCTTGTCTCCTTT
eNOS (AB)	F	AAGCGAGTGAAGGCGACAAT
	R	GAGGGACACCACGTCATACTCA
PDGFB (AB)	F	AGCTTGGCTCGTGGAAGAAG
	R	TTGCACTCGGCGATCATG
PTX3 (AB)	F	CAATGGACTCCATCCCACTGA
	R	GATGAAGAGCTTGTCCCATTCC
TGF β 1 (AB)	F	AGGGCTACCATGCCAACTTCT
	R	CCGGGTTATGCTGGTTGTACA
TIMP-1 (AB)	F	CGCAGCGAGGAGTTTCTCAT
	R	GCTGAGCTAAGCTCAGGCTGTT
uPA (AB)	F	CTGTGACCAGCACTGTCTCAGTTT
	R	CCCAGTGAGGATTGGATGAACATA
VEGF (AB)	F	TGCCCACTGAGGAGTCCAA
	R	TTTGTGTGCTGTAGGAAGCTCAT

ml sont récupérés et conservés à -70°C. Le dosage de la concentration en ARN peut s'effectuer avant la congélation comme décrit ci-dessus.

b) Rétro-transcription

La rétro-transcription s'effectue à l'aide du « kit Roche » qui contient tous les réactifs nécessaires à la rétro-transcription et permet de synthétiser de l'ADNc à partir de l'ARN extrait. Tout d'abord, 2 µg d'ARN sont dilués avec de l'eau RNase-free pour atteindre un volume de 12 µl auquel est ajouté 1 µl d'oligo dT (amorces). Ce mélange est chauffé pendant 10 minutes à 65°C en vue de dénaturer les structures secondaires potentielles de l'ARN et ensuite immédiatement refroidi sur glace et spinné. A chaque échantillon gardé sur glace sont ajoutés 7 µl de mélange réactionnel nécessaire à la rétro-transcription contenant 4 µl de tampon, 0,5 µl de transcriptase inverse, 0,5 µl d'inhibiteurs de RNases et 2 µl d'un mix de dNTP. Les échantillons, vortexés et spinnés, sont alors placés pendant 30 minutes à 55°C afin de permettre la polymérisation. Après la demi-heure, les échantillons sont spinnés et incubés 5 minutes à 85°C pour inactiver la transcriptase inverse. L'ADNc est ensuite placé sur glace, spinné, et stocké à -20°C (Tableau II.4).

c) PCR en temps réel

Les ADNc obtenus par rétro-transcription des ARN totaux sont dilués 100x et 5 µl sont ajoutés à 20 µl de mix contenant 12,5 µl de SYBR Green, 2,5 µl d'eau distillée, 2,5 µl d'amorces forward 3 µM ou 9 µM et 2,5 µl d'amorces reverse 3 ou 9 µM pour obtenir une concentration finale des amorces de 300 ou 900 nM. Chaque échantillon est mesuré en double et le gène de référence est RPL13 (HKG). De plus, par gène étudié, deux puits sont consacrés aux blancs dans lesquels de l'eau et non de l'ADNc est mélangée au mix. Une fois les échantillons dilués et les mix préparés, la plaque est remplie en ajoutant d'abord 20 µl de mix dans chaque puits auxquels sont ajoutés 5 µl d'ADNc dilués 100x ou 5 µl d'eau (blancs). La plaque est alors scellée, centrifugée 1 minute à 600 rpm et placée dans la machine avec un caoutchouc dessus. La PCR commence par une étape de dénaturation s'effectuant à 95°C pendant 10 minutes suivie par 40 cycles de dénaturation (95°C, 15 secondes) – hybridation et élongation des amorces (60°C, 1 minute) (Tableau II.5). La quantité relative d'ARNm est ensuite étudiée sur base des valeurs Ct obtenues pour chaque échantillon et chaque gène. Pour chaque échantillon, le Ct du HKG (gène ne variant pas entre les conditions) est soustrait du Ct du gène d'intérêt afin de normaliser la quantité d'ADNc chargée dans chaque puits :

$$\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ HKG}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ du gène dans une condition} - \Delta Ct \text{ du gène dans la condition contrôle (normoxie seule)}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{niveau d'induction ou de répression du gène par rapport à la normoxie}$$

4) Dosage de la concentration en protéines

4.1. Par la méthode de Pierce avec ajout d'un réactif compatible avec l'usage de détergents

Le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce est basé sur le changement d'absorbance d'un colorant suite à sa liaison aux protéines. Le dosage avec le colorant Pierce s'effectue en plaque 96 puits et l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 660 nm. Les détergents ioniques, comme le SDS contenu dans le tampon de lyse utilisé pour révéler ICAM-1 en western blot (WB), sont incompatibles avec les réactifs colorés. En effet, le SDS se fixe (Pierce/Bradford) ou réduit (Folin) les réactifs produisant le composé coloré. Un additif rajouté dans la solution de Pierce rend ce réactif le seul fiable et compatible avec l'utilisation de détergents. Toute mesure s'effectue en double et une moyenne est calculée. Afin de pouvoir déterminer la concentration en protéines en fonction de l'absorbance, une courbe d'étalonnage est réalisée. Celle-ci est obtenue par la mesure de

Tableau II.6 : Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Pierce – Matériel

Plaque 96 puits non stérile (#655101, microplates 96-wells, flat bottom, Greiner bio-one, Germany)
BSA (Bovine Serum Albumin, concentration stock de 2 µg/µl ; Pierce, Thermo Scientific, USA)
Solution de Pierce (Pierce 660 nm protein assay, #22660, Thermo Scientific, USA) avec un additif “Tonic Detergent Compatibility Reagent” (#22663, Thermo Scientific, USA)
Agitateur (Electronic Schüttler MTS 2, IKA, Germany)
Spectrophotomètre (Microplate Spectrophotometer xMark, Bio-rad, USA)

Tableau II.7 : Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Folin-Lowry – Matériel

PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH_2PO_4 (Merck, Germany) / K_2HPO_4 (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
NaOH (Merck, Germany) 0,5 N et 2 N	
Tubes à Bradford (Kartel, Italy)	
BSA (Bovine Serum Albumin, concentration stock de 2 µg/µl ; Pierce, Thermo Scientific, USA) diluée 2,5x	
100 µg/ml : 19 µl BSA diluée + 37,5 µl NaOH 2N + 93,5 µl H_2O	
200 µg/ml : 37,5 µl BSA diluée + 37,5 µl NaOH 2N + 75 µl H_2O	
400 µg/ml : 75 µl BSA diluée + 37,5 µl NaOH 2N + 37,5 µl H_2O	
Solution A	1 ml Na_2CO_3 2% (Merck, Germany) 10 µl Tartrate de Na et K 2% (Merck, Germany) 10 µl CuSO_4 1% (#6008, UCB, Belgium)
Réactif Folin-Ciocalteu (Merck, Germany) dilué 2x dans de l' H_2O	
Spectrophotomètre (Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare, UK)	

l'absorbance de différentes concentrations de BSA (0 µg/µl (blanc pour les autres valeurs de BSA) ; 1 µg/µl ; 2,5 µg/µl ; 5 µg/µl ; 7,5 µg/µl ; 10 µg/µl), diluée dans de l'eau pour atteindre un volume total de 10 µl. Un blanc avec le tampon de lyse est également réalisé (1 µl + 9 µl d'eau) et la valeur d'absorbance de ce blanc est retirée de la moyenne de l'absorbance de chaque échantillon (1 µl + 9 µl d'eau). Lorsque les 10 µl sont déposés dans chaque puits, 150 µl de solution de Pierce avec additif sont ajoutés à l'aide d'une pipette multi-channel. La plaque 96 puits est placée sur un agitateur pendant 5 minutes et l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Tableau II.6). La concentration de chaque échantillon est alors établie sur base de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) sachant que le y représente l'absorbance et le x la concentration en protéines.

4.2. Par la méthode de Folin

La méthode de dosage de la concentration en protéines de Folin-Lowry se base sur une réaction de réduction donnant lieu à un composé coloré (bleu). Le NaOH utilisé pour lyser les cellules dénature également les protéines exposant ainsi leurs résidus aux réactifs. Les protéines dénaturées sont traitées avec une solution alcaline contenant des ions Cu^{2+} se liant aux atomes d'azote des liens peptidiques. Le cuivre permet de rendre la réaction plus sensible en favorisant le transfert d'électrons et donc en catalysant la réaction de réduction en milieu alcalin. Les anions phosphomolybdate et phosphotungstate contenus dans le réactif de Folin sont réduits par les résidus aromatiques (noyau phénolique) des acides aminés comme les tyrosines et tryptophanes, menant à la formation d'un composé bleu. La grande sensibilité de cette méthode en est sa principale qualité (jusqu'à 5 µg de protéines sont dosables).

Ce type de dosage est utilisé dans ce travail pour normaliser les résultats des ELISA et la quantité de surnageant chargée sur les zymogrammes. Une fois les surnageants récoltés, les puits sont rincés avec 1 ml de PBS non stérile. Le PBS est ensuite décanté et 200 µl de NaOH 0,5 N sont ajoutés dans chaque puits et laissés sous agitation pendant 30 minutes pour que la lyse cellulaire et la dénaturation des protéines se réalisent. Les lysats cellulaires sont récupérés dans des eppendorfs et sont soit conservés à -20°C , soit utilisés directement pour le dosage. Le dosage s'effectue en tubes à Bradford. Le blanc (150 µl de NaOH 0,5N) et les différentes dilutions de la BSA (100 µg/ml ; 200 ; 400) sont réalisés en double au contraire des échantillons, réalisés en simple (150 µl utilisés par mesure). Après avoir déposé 150 µl de NaOH 0,5N, de BSA diluée (laisser agir 30 minutes dans le NaOH 2N) ou d'échantillon à doser, 750 µl de solution A sont ajoutés dans chaque tube. 10 minutes plus tard, 75 µl de réactif de Folin dilué 2x sont ajoutés de 30 secondes en 30 secondes, tube après tube. La lecture au spectrophotomètre ($\lambda=740\text{ nm}$) doit ensuite se faire 30 minutes après l'ajout du réactif et toujours de 30 secondes en 30 secondes (Tableau II.7).

5) Mesure de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF dans le milieu

5.1. Principe

L'ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) est une technique biochimique utilisée pour détecter et quantifier la présence d'un antigène, ici l'IL-6, l'IL-8 ou le bFGF, dans un surnageant ou un lysat cellulaire. Elle se réalise en plaques 96 puits où les puits ont été recouverts d'anticorps monoclonaux spécifiques pour l'antigène à doser. Ainsi, lorsque le surnageant est déposé dans le puits, toutes les molécules d'IL-6, d'IL-8 ou de bFGF présentes se lient aux anticorps immobilisés et ne sont donc pas éluées lors des lavages. Un anticorps polyclonal spécifique pour ces antigènes et couplé à une peroxydase est alors ajouté ainsi qu'une solution contenant le substrat de l'enzyme (peroxyde d'hydrogène et tetramethylbenzidine), déclenchant une réaction colorimétrique proportionnelle à la quantité d'IL-6, d'IL-8 ou de bFGF liée à l'étape initiale. Le développement colorimétrique est ensuite

Tableau II.8 : Mesure de la sécrétion d'IL-6 ou d'IL-8 – Matériel

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH_2PO_4 (Merck, Germany) / K_2HPO_4 (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Eppendorfs de 1,5 ml (Sarstedt, Germany)	
NaOH (Merck, Germany) 0,5 N	
Milieu CO_2 -indépendant (GIBCO, UK) + 0,5 mM L-glutamine (Sigma, USA)	
Balance (#BP 211D, Sertorius, Germany)	
Centrifugeuse 4°C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Germany)	
Kit ELISA IL-6 (#D6050, R&D Systems, Minneapolis, USA)	
Kit ELISA IL-8 (#DC8000C, R&D Systems, Minneapolis, USA)	
Spectrophotomètre (Microplate Spectrophotometer xMark, Bio-rad, USA)	

Tableau II.9 : Mesure de la sécrétion de bFGF – Matériel

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH_2PO_4 (Merck, Germany) / K_2HPO_4 (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Eppendorfs de 1,5 ml (Sarstedt, Germany)	
NaOH (Merck, Germany) 0,5 N	
Milieu CO_2 -indépendant (GIBCO, UK) + 0,5 mM L-glutamine (Sigma, USA)	
Milieu DHG-L1+10% sérum contenant 25 mU/ml d'héparinase I	Milieu DHG-L1 : DMEM (Dulbecco's modified eagle medium : GIBCO, UK) supplémenté avec 18 mM de NaHCO_3 (Merck, Germany) 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO, UK) Heparinase I (#H2519, Sigma-Aldrich, USA)
Centrifugeuse 4°C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Germany)	
Kit ELISA bFGF (#DFB50, R&D Systems, Minneapolis, USA)	
Spectrophotomètre (Microplate Spectrophotometer xMark, Bio-rad, USA)	

stoppé grâce à l'ajout d'acide sulfurique 2N et l'absorbance du produit de la réaction est mesurée par spectrophotométrie.

5.2. Méthode

a) Préparation des échantillons pour mesurer la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8

Les cellules EAhy926 sont repiquées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits. 20h après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par 1 ml (précisément) de milieu CO₂-indépendant complétement en L-glutamine. Les cellules sont alors incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Après l'incubation, les surnageants sont récoltés et les puits contenant toujours les cellules sont rincés avec 1 ml de PBS. Une fois le PBS décanté à la trompe à vide, la lyse cellulaire est réalisée par ajout de NaOH 0,5N et la concentration en protéines est ensuite déterminée par un dosage de Folin (voir point 4.2). Les surnageants sont récoltés et portés exactement au même volume. En effet, une légère évaporation du milieu se produit lors des 6h d'incubation avec ou sans réoxygénation dans l'atmosphère sèche à 37°C de la chambre chaude. Certains surnageants sont donc plus concentrés et il est important de tous les rapporter à un volume final de 1 ml à l'aide de milieu CO₂-indépendant complétement en L-glutamine et d'une balance. Les surnageants sont ensuite centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C et 800 μ l de chacun d'eux sont récoltés, aliquotés en 4 eppendorfs de 200 μ l afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation, et conservés à -70°C (Tableau II.8).

b) Préparation des échantillons pour mesurer la sécrétion de bFGF

Les cellules EAhy926 sont repiquées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits. 20h après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par 1 ml de milieu CO₂-indépendant complétement en L-glutamine. Les cellules sont alors incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Après l'incubation, le milieu CO₂-indépendant est complètement décanté et 1 ml (précisément) de DHG-L1 contenant 10% de sérum et 25 mU/ml d'héparinase I sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques 24 puits sont ensuite placées dans l'étuve sèche à 37°C pendant 3h pour permettre la sécrétion du bFGF ne se réalisant qu'en présence de sérum. Le bFGF, faisant partie de la famille des « heparin-binding growth factors », est libéré de l'héparine grâce à l'activité de l'héparinase I dégradant l'héparine et l'héparan sulfate. Les surnageants sont ensuite récoltés et les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS. Le PBS est ensuite décanté et 200 μ l de NaOH 0,5N sont ajoutés (voir point 4.2). Les surnageants sont centrifugés 5 min à 13 000 rpm et 600 μ l de chacun d'eux sont récoltés, aliquotés en 2 eppendorfs de 300 μ l et conservés à -70°C (Tableau II.9).

c) ELISA IL-6, IL-8 et bFGF

Le dosage de la concentration en IL-6, en IL-8 ou en bFGF dans les milieux récoltés se réalise à l'aide d'un kit ELISA. Le protocole se déroule selon les instructions du fournisseur et la concentration de ces antigènes (pg/ml) est déterminée en fonction de l'absorbance mesurée (Tableaux II.8 et II.9). En effet, les dilutions en série des standards IL-6, IL-8 ou bFGF permettent de fournir une équation de droite donnant la concentration en fonction de l'absorbance ($y = ax + b$ où y représente l'absorbance et x la concentration en pg/ml). Pour chaque puits, la concentration en IL-6, IL-8 ou bFGF est normalisée sur la concentration en protéines du lysat cellulaire obtenue par un dosage de Folin ; ceci permettant de mesurer une sécrétion indépendamment des variations du nombre de cellules entre chaque puits. Les résultats sont exprimés en picogrammes d'IL-6, d'IL-8 ou de bFGF par microgramme de protéines.

Tableau II.10: Extraction protéique (protéines membranaires) - Matériel

Boîtes de culture de 25 cm ² (T25 ; Costar, Corning, USA)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany) / K ₂ HPO ₄ (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Racloirs (SPL Life Sciences, Korea)	
Eppendorfs de 1,5 ml (Sarstedt, Germany)	
Centrifugeuse à godets pivotants (#1-15PK, Sigma, Germany)	
PIC (Phosphatase Inhibitor Cocktail)	Dissoudre une tablette dans 2 ml H ₂ O : complete protease inhibitor cocktail tablets 25x (Roche, Germany)
PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer)	25 mM Na ₃ VO ₄ (Sigma, USA) 250 mM PNPP (paranitrophenylphosphate) (Sigma, USA) 250 mM β-glycérophosphate (VWR, France) 125 mM NaF (Merck, Germany)
Tampon de lyse	10 mM Tris pH 7,5 (Merck, Germany) 0,1 mM EDTA (Merck, Germany) 0,1 mM EGTA (Merck, Germany) 0,5% SDS (MP Biomedicals, LLC, USA) + à rajouter au dernier moment : 0,1 mM β-mercaptoéthanol (Fluka, Biochemika, Sigma-Aldrich, Germany), PIC 25x, PIB 25x
Sonicateur (Sonics & Materials, USA)	

Tableau II.11 : Western blot – Matériel

Electrophorèse	Cuve d'électrophorèse (Amersham Biosciences, USA) Etalon de poids moléculaire See Blue Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen, USA) Running buffer 1x Générateur (Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Pharmacia Biotech, USA)
Transfert sur membrane	Membrane PVDF (Immobilon-FL, Millipore Corporation, USA) Methanol 100% (Acros Organics, USA) Blotting buffer 4 papiers Whatman (Merck, Germany) 2 éponges Appareil de transfert (TE77 PWR ; Amersham Biosciences, USA)
Révélation	Solution LI-COR (Blocking buffer, Odyssey, LI-COR, Biosciences, USA) : diluée 2x dans du PBS non stérile pour le blocking Tween 20 (Merck, Germany) Anticorps primaire : dilué dans la solution LI-COR contenant 0,1% de Tween 20 PBS-tween 20 0,1% et PBS seul Anticorps secondaire : dilué dans la solution LI-COR contenant 0,1% de Tween 20 Scanner Odyssey Image System (#9120, LI-COR, Biosciences, USA avec le programme Odyssey V3.0)

6) Extraction protéique

Cette méthode d'extraction utilise un tampon de lyse puissant contenant du SDS permettant de décrocher les protéines enchâssées en membrane. Ce protocole d'extraction a été utilisé pour visualiser ICAM-1 en western blot. Les cellules sont repiquées en T25 à une densité de 2.10^6 cellules/T25. Environ 20h après le repiquage, le milieu de culture est remplacé par du milieu CO₂-indépendant supplémenté en L-glutamine. Les cellules sont incubées pendant 6h en N, HC ou HI en présence ou non de TNF- α et ensuite laissées en réoxygénation pendant 16h. Après l'incubation, les cellules sont rincées trois fois avec 5 ml de PBS non stérile froid. Le PBS est complètement décanté et les cellules sont raclées dans 400 μ l de PBS en évitant de les lyser. Elles sont alors récupérées et collectées dans un eppendorf. Ensuite, 200 μ l de PBS sont de nouveau ajoutés dans la T25 afin de récolter les cellules encore présentes. Les 600 μ l de suspension cellulaire sont centrifugés 5 minutes à 500g et à 4°C. Le surnageant est délicatement enlevé et 70 μ l de tampon de lyse sont ajoutés sur le culot de cellules. Suite à l'ajout du tampon de lyse, les lysats ne doivent pas être placés au contact direct de la glace afin d'éviter toute précipitation mais doivent être conservés dans un environnement froid. Les échantillons sont ensuite soniqués (5x 10 secondes) jusqu'à obtenir un lysat parfaitement liquide. La concentration en protéines est déterminée par un dosage de Pierce rendu compatible avec le SDS utilisé dans le tampon de lyse par l'ajout d'un additif (voir point 4.1). Une fois le dosage réalisé, les lysats sont conservés à -70°C (Tableau II.10).

7) Western Blot

7.1. Principe

Cette technique permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire, de les détecter et de quantifier leur abondance de manière semi-quantitative. Les échantillons protéiques sont dénaturés à haute température et par la présence de SDS, un détergent anionique dissociant les protéines en polypeptides, les dénaturant et se liant à ceux-ci leur conférant une charge globale négative et masquant la charge intrinsèque de la protéine native. Ces échantillons sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide et la migration se réalise grâce à la présence d'un courant électrique. Après la migration, les protéines sont transférées du gel sur une membrane permettant la reconnaissance de protéines d'intérêt grâce à des anticorps primaires dirigés contre celles-ci et à des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome et dirigés contre le fragment Fc des anticorps primaires.

7.2. Méthode (Tableaux II.11 et II.12)

a) Préparation des échantillons

Un volume précis de chaque extrait protéique total, déterminé sur base de la concentration en protéines, est prélevé de façon à charger la même quantité de protéines pour chaque échantillon. Ceux-ci sont portés à un volume final identique avec le spacer gel buffer et le bleu de charge 5X. Ils sont ensuite chauffés 4 minutes à 100°C et spinnés 2 minutes à 13 000 rpm.

b) Electrophorèse

Une fois le montage des plaques réalisé, un gel séparateur de 10% d'acrylamide (pour ICAM-1 et bFGF) est coulé jusqu'à 0,5-1 cm en dessous du peigne (Tableau II.13). Le gel est ensuite recouvert d'isobutanol isolant le gel de l'oxygène et favorisant ainsi la polymérisation. Après 1h de polymérisation, l'isobutanol est enlevé et le dessus du gel séparateur est abondamment rincé à l'eau, entièrement retirée à l'aide d'un papier Whatman. Le gel concentrateur est ensuite coulé au dessus du gel séparateur et un peigne est posé pour former les puits de

Tableau II.12 : Solutions à préparer pour les gels SDS-PAGE (petits et grands)

Gel buffer	Pour 200 ml : 36,3 g de Tris-HCl pH 8,9 (Merck, Germany) 0,8 g de SDS (MP Biomedicals, USA)
Spacer gel buffer	Pour 200 ml : 10,2 g de Tris-HCl pH 6,8 (Merck, Germany) 0,8 g de SDS (MP Biomedicals, USA)
Bleu de charge 5x	2 ml de Tris 0,5 M pH 6,8 (ou utiliser le spacer gel buffer) (Merck, Germany) 2 ml de SDS 20% (MP Biomedicals, USA) 1 ml de β -mercaptoéthanol (Fluka, Biochemika, Sigma-Aldrich, Germany) 2 ml de glycérol (Merck, Germany) 3,5 mg de bleu de bromophénol (Merck, Germany)
Running buffer 10x	Pour 1 L : 30 g de Tris (Merck, Germany) 140 g de glycine (Merck, Germany) 10 g de SDS (MP Biomedicals, USA)
Blotting buffer	Pour 1 L : 4,8 g de Tris (Merck, Germany) 23 g de glycine (Merck, Germany) 200 ml de méthanol (Acros Organics, USA)

Tableau II.13 : Gel séparateur 10%

<u>Mix</u>	<u>Mini gel SDS-PAGE 10%</u>	<u>Grand gel SDS-PAGE 10%</u>
Gel buffer	3,75 ml	8,4 ml
30% Acrylamide/bis (Bio-Rad, USA)	5 ml	11,6 ml
H ₂ O	5,5 ml	15 ml
APS (GE Healthcare, Sweden)	APS 1% : 750 μ l	APS 25 % : 175 μ l
TEMED (GE Healthcare, Sweden)	15 μ l	10,5 μ l

Tableau II.14 : Gel concentrateur

<u>Mix</u>	<u>Mini gel SDS-PAGE</u>	<u>Grand gel SDS-PAGE</u>
Spacer gel buffer	1,875 ml	2,5 ml
30% Acrylamide/bis (Bio-Rad, USA)	0,75 ml	1,7 ml
H ₂ O	4,125 ml	5,8 ml
APS (GE Healthcare, Sweden)	APS 1% : 750 μ l	APS 25 % : 50 μ l
TEMED (GE Healthcare, Sweden)	7,5 μ l	10 μ l

Tableau II.15 : Anticorps primaires utilisés en western blot

<u>Anticorps primaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Espèce</u>	<u>Référence</u>
α -tubuline	20 000x	Souris	#T5168 (Sigma, USA)
ICAM-1	500x	Lapin	#sc-7891 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
bFGF	1000x	Souris	#05-118 (Millipore, USA)

Tableau II.16 : Anticorps secondaires utilisés en western blot (LI-COR)

<u>Anticorps secondaire</u>	<u>Dilution</u>	<u>Référence</u>
Goat Anti-mouse 700	20 000x	#926-32220 (LI-COR, Biosciences, USA)
Goat Anti-rabbit 800	7000x	#926-32211 (LI-COR, Biosciences, USA)
Goat Anti-mouse 800	7000x	#926-32210 (LI-COR, Biosciences, USA)

chargement (Tableau II.14). Après 45 minutes de polymérisation, le peigne est enlevé et les puits sont rincés avec du tampon d'électrophorèse 1X.

Pour un mini gel SDS-PAGE (ICAM-1), le fond du support est déclipé et le gel est placé dans la cuve de migration dans laquelle 1L de tampon d'électrophorèse 1X est ajouté. Les puits sont alors chargés avec 3 µl d'étalon de poids moléculaire ou 20 µl d'échantillon. Une fois les échantillons chargés, les bulles d'air situées entre les deux plaques côté inférieur sont retirées à l'aide d'une seringue. La cuve est alors fermée et les électrodes branchées à un générateur réglé sur 200 Volts. La migration est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bas du gel (+/- 1h de migration).

Pour un grand gel SDS-PAGE (bFGF), les échantillons sont chargés avec 7 µl d'étalon de poids moléculaire ou 20 µl d'échantillon. Ensuite, les plaques sont décrochées du support portatif et accrochées au support avec l'électrode. Les plaques sont déposées dans la cuve où 3L de tampon d'électrophorèse sont ajoutés. Les bulles d'air situées dans le bas entre les deux plaques sont retirées. La cuve est fermée et les électrodes branchées à un générateur. La migration s'effectue à 35 mA dans le gel concentrateur et à 45 mA dans le gel séparateur. Elle est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bas du gel (+/- 3h de migration).

c) Transfert des protéines sur une membrane

Une membrane PVDF (polyvinylidène fluoride) LF (low fluorescence) et quatre papiers Whatman sont découpés à la taille du gel séparateur. La membrane est d'abord réhydratée pendant 1 minute dans du méthanol 100% et ensuite équilibrée pendant 5 minutes dans du tampon de transfert. Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est démoulé et seul le gel séparateur est gardé pour le transfert. Les papiers Whatman ainsi que les éponges utilisées sont immergés dans le tampon de transfert. Dans le cas de grosses protéines comme ICAM-1, le gel doit être brièvement rincé dans le tampon de transfert et non pas y baigner. Les différents éléments sont alors placés dans l'appareil de transfert selon un ordre précis du bas vers le haut : film plastique (pour canaliser le courant sur la zone à transférer), une éponge, deux papiers Whatman, la membrane, le gel, deux papiers Whatman, une éponge. Le transfert est alors réalisé soit 2h à 1 mA/cm², soit toute la nuit à 30 mA.

d) Traitement de la membrane et révélation

Après le transfert des protéines sur la membrane, celle-ci est récupérée et bloquée pendant 1h à température ambiante avec l'agent bloquant LI-COR dilué 2x dans du PBS non stérile afin de saturer tous les sites de liaison aspécifique des anticorps sur la membrane. La membrane est ensuite mise en présence pendant 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué de manière appropriée dans la solution LI-COR contenant 0,1% de Tween (Tableau II.15). La solution est récupérée et congelée à -20°C pour une future réutilisation de l'anticorps. La membrane est ensuite lavée 4x 5 minutes avec du PBS-Tween 0,1% et incubée pendant 1h à température ambiante à l'obscurité avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dilué dans une solution LI-COR contenant 0,1% de Tween (Tableau II.16). Après l'incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est de nouveau lavée 4x 5 minutes avec du PBS-Tween 0,1% et ensuite 2x 5 minutes avec du PBS sans Tween. Elle est alors séchée pendant 30 minutes en chambre chaude (37°C) à l'abri de la lumière et scannée à l'aide de l'« Image System Odyssey».

8) Marquage en immunofluorescence

8.1. Principe

Le marquage en immunofluorescence permet de visualiser une protéine d'intérêt et d'en estimer son abondance relative grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique, appelé primaire, reconnaissant la protéine et d'un anticorps, appelé secondaire, reconnaissant la chaîne lourde

Tableau II.17 : Marquage en immunofluorescence – Matériel

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets de 13 mm de diamètre (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Germany)	
Lames porte-objet (VWR, Leuven)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH_2PO_4 (Merck, Germany) / K_2HPO_4 (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Paraformaldéhyde 4% (PFA)	4 g de PFA (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
Triton X-100 1%	1 g de Triton X-100 (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
PBS-BSA 2%	2 g de BSA (Bovine Serum Albumin ; PAA laboratories, Austria) 100 ml de PBS non stérile
Marquage des noyaux	1 μl de TOPRO-3 (T3605, Molecular Probes, USA) 79 μl de RNase (Ribonuclease beef pancreas, IGN, USA ; 2mg/ml en PBS)
Mowiol (Sigma-Aldrich, Germany-UK)	
Microscope confocal à fluorescence TCS SP5 (Leica, Germany)	

Tableau II.18 : Anticorps utilisés en immunofluorescence

Anticorps primaire	Dilution	Espèce	Référence
ICAM-1	100x	souris	#BBA3 (R&D Systems, USA)
bFGF	100x	souris	#05-118 (Millipore, USA)
Anticorps secondaire	Dilution	Espèce	Référence
Alexa Fluor 488 nm	1000x	goat anti-mouse IgG	#A-11001 (Molecular Probes, USA)

(dépendante de l'espèce) du premier anticorps et couplé à un fluorochrome (immunofluorescence indirecte permettant une amplification du signal). Suite à l'excitation par un laser à une longueur d'onde particulière, le fluorochrome va émettre de la fluorescence permettant la détection de la protéine et cela grâce à un microscope confocal.

8.2. Méthode

Les cellules EAhy926 sont ensemencées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits sur des couvre-objets stérilisés à l'alcool ou à l'autoclave. 20h après le repiquage, les cellules sont incubées pendant 6h en N, HC ou HI en présence ou non de TNF- α . Après les 6h d'incubation et après les 6h suivies de 4h ou de 16h de réoxygénation, les surnageants sont décantés et les cellules sont fixées sur les couvre-objets pendant 10 minutes avec du PBS-PFA 4%. Les puits sont ensuite rincés 3x pendant 5 minutes avec du PBS et laissés toute la nuit dans du PBS en chambre froide pour réaliser le marquage de la protéine d'intérêt simultanément pour les trois temps. En fonction de la protéine à visualiser, les cellules sont perméabilisées (bFGF) ou non (ICAM-1) pendant 4 minutes avec du PBS-Triton 1%. Les puits sont rincés 3x 10 minutes avec du PBS-BSA 2% et une chambre humide est préparée dans une grande boîte de Pétri en verre en disposant un papier Whatman dans le fond. Un parafilm est ensuite déposé au-dessus du papier Whatman humidifié permettant d'incuber les cellules avec l'anticorps primaire. Pour ce faire, chaque couvre-objet est récupéré du fond du puits et est retourné sur 30 μ l d'anticorps primaire dilué 100x dans du PBS-BSA 2% déposés sur le parafilm pour chaque couvre-objet excepté celui faisant office de contrôle négatif pour l'anticorps secondaire (uniquement incubé avec celui-ci et déposé sur 30 μ l de PBS-BSA 2%). Ce retournement est essentiel au contact entre les cellules et l'anticorps ; les cellules adhérant à la face supérieure du couvre-objet. Cette incubation en présence de l'anticorps primaire se fait pendant 2h à température ambiante. Les couvre-objets sont alors replacés dans le bon sens (retournement) au fond de leur puits où les cellules sont lavées 3x avec du PBS-BSA 2%. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1h à température ambiante et dans l'obscurité en présence de 30 μ l d'anticorps secondaire dilué 1000x déposés sur un nouveau parafilm dans la chambre humide excepté pour le contrôle négatif de l'anticorps primaire seul déposé dans 30 μ l de PBS-BSA 2%. Les cellules sont ensuite rincées 3x avec du PBS-BSA 2% et 1x avec du PBS seul. Pour le marquage des noyaux, les cellules sont incubées pendant 35 minutes dans l'obscurité avec du TOPRO-3, agent intercalant de l'ADN, dilué 80x dans du PBS contenant 2 mg/ml de RNase. Les cellules sont ensuite rincées 3x avec 1 ml de PBS. Puis, les couvre-objets sont montés sur lames porte-objets à l'aide d'une goutte de Mowiol préchauffé à 57°C. Les lames sont conservées à 4°C avant d'être observées au microscope confocal en gardant le photomultiplicateur constant (Tableaux II.17 et II.18).

9) Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde mitotracker Red CMXRos

9.1. Principe de la sonde

La sonde mitotracker Red CMXRos diffuse passivement à travers la membrane plasmique et s'accumule dans les mitochondries actives suite à un potentiel de membrane. Elle constitue un dérivé de la X-rosamine donnant un marquage rouge et est facilement éliminée des mitochondries ayant perdu leur potentiel de membrane. La sonde n'est ainsi fonctionnelle que dans les cellules vivantes où elle devient fluorescente une fois oxydée. Ce type de sonde autorise le traitement des cellules avec un agent de fixation dérivé de l'aldéhyde ainsi qu'avec un agent de perméabilisation sans perdre le marquage mitochondrial. En effet, la sonde oxydée réagit avec les thiols des protéines et peptides pour former un conjugué pouvant être fixé par l'aldéhyde.

Tableau II.19 : Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde mitotracker Red CMXRos

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets de 13 mm de diamètre (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Germany)	
Lames porte-objet (VWR, Leuven)	
Sonde mitotracker Red CMXRos (#M7512 ; Invitrogen, Molecular Probes, USA) Concentration stock : 1 mM dans du DMSO	250 nM dans du milieu CO ₂ -indépendant (GIBCO, UK) contenant 0,5 mM de L-glutamine (Sigma, USA)
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany) / K ₂ HPO ₄ (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Paraformaldéhyde 4% (PFA)	4 g de PFA (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
Triton X-100 1%	1 g de Triton X-100 (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
PBS-BSA 2%	2 g de BSA(Bovine Serum Albumin ; PAA laboratories, Austria) 100 ml de PBS non stérile
Marquage des noyaux	1 µl de ToPro3 (T3605, Molecular Probes, USA) 79 µl de RNase (Ribonuclease beef pancreas, IGN, USA ; 2mg/ml en PBS)
Glycergel (#C0563, DarkoCytomation, USA)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, Germany)	

Tableau II.20 : Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde lysotracker Red DND-99

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
Lamelles couvre-objets de 13 mm de diamètre (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Germany)	
Lames porte-objet (VWR, Leuven)	
Sonde lysotracker Red DND-99 (#L7528 ; Invitrogen, Molecular Probes, USA) Concentration stock : 1 mM dans du DMSO	100 nM dans du milieu CO ₂ -indépendant (GIBCO, UK) contenant 0,5 mM L-glutamine (Sigma, USA)
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany) / K ₂ HPO ₄ (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Paraformaldéhyde 4% (PFA)	4 g de PFA (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
Triton X-100 1%	1 g de Triton X-100 (Merck, Germany) 100 ml de PBS non stérile
PBS-BSA 2%	2 g de BSA(Bovine Serum Albumin ; PAA laboratories, Austria) 100 ml de PBS non stérile
Marquage des noyaux	1 µl de ToPro3 (T3605, Molecular Probes, USA) 79 µl de RNase (Ribonuclease beef pancreas, IGN, USA ; 2mg/ml en PBS)
Mowiol (Sigma-Aldrich, Germany-UK)	
Microscope confocal à fluorescence (Leica, Germany)	

9.2. Méthode

Les cellules EAhy926 sont ensemencées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits sur des couvre-objets stérilisés à l'alcool ou à l'autoclave. 20h après le repiquage, les cellules sont incubées pendant 6h en N, HC ou HI en présence ou non de TNF- α . Après l'incubation (6h et 6h+16h de réoxygénation), le milieu des puits est décanté et remplacé par 1 ml de milieu contenant la sonde mitotracker Red CMXRos à une concentration finale de 250 nM. L'incubation a lieu pendant 20 minutes à 37°C dans l'étuve sèche. Les cellules sont ensuite rincées 2x au PBS et fixées 10 minutes avec du PBS-PFA 4%. Les puits sont ensuite rincés 3x pendant 5 minutes avec du PBS et laissés toute la nuit dans du PBS en chambre froide pour réaliser le marquage de la protéine d'intérêt simultanément pour les deux temps (6h et 6h+16hR). Les cellules sont perméabilisées pour marquer le bFGF pendant 4 minutes avec du PBS-Triton 1%. La suite du protocole est la même que pour le marquage en immunofluorescence classique jusqu'à l'étape de montage des couvre-objets sur les lames. En effet, le Mowiol n'est pas compatible avec l'utilisation de la sonde car le signal fluorescent n'est pas stabilisé et très rapidement perdu lorsqu'on observe les lames au microscope confocal. Un autre milieu de montage, le glycergel, a donc été utilisé (Tableau II.19).

10) Co-marquage en immunofluorescence avec la sonde lysotracker Red DND-99

10.1. Principe

La sonde lysotracker Red DND-99 fluorescente diffuse passivement les membranes cellulaires et s'accumule avec une haute spécificité dans les organites acides. Cette sonde est constituée par une base faible liée à un fluorophore et permet le marquage des structures sphériques acides à l'intérieur des cellules vivantes à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. Le mécanisme par lequel les sondes sont retenues dans ces compartiments n'est pas encore réellement compris mais il implique probablement la protonation et ainsi la rétention dans ces organites.

10.2. Méthode

Les cellules EAhy926 sont ensemencées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits sur des couvre-objets stérilisés à l'alcool ou à l'autoclave. 20h après le repiquage, les cellules sont incubées pendant 6h en N, HC ou HI en présence ou non de TNF- α . Après l'incubation (6h et 6h+16h de réoxygénation), le milieu des puits est décanté et remplacé par 1 ml de milieu contenant la sonde lysotracker Red DND-99 à une concentration finale de 100 nM. L'incubation a lieu pendant 30 minutes à 37°C dans l'étuve sèche. Les cellules sont ensuite rincées 2x au PBS et fixées 10 minutes avec du PBS-PFA 4%. Les puits sont ensuite rincés 3x pendant 5 minutes avec du PBS et laissés toute la nuit dans du PBS en chambre froide pour réaliser le marquage de la protéine d'intérêt, ici le bFGF, simultanément pour les deux temps (6h et 6h+16hR). Les cellules sont perméabilisées pendant 4 minutes avec du PBS-Triton 1%. La suite du protocole est la même que pour le marquage en immunofluorescence classique avec le Mowiol comme milieu de montage (Tableau II.20).

11) Mesure de l'activité des MMPs par zymographie

11.1. Principe

La zymographie permet de détecter la présence d'enzymes particulières dans un surnageant, un lysat ou un fluide, et de caractériser leur activité selon le substrat de digestion utilisé. En effet, des échantillons dénaturés à la chaleur sont chargés sur un gel de polyacrylamide contenant un substrat de digestion choisi et correspondant aux enzymes voulant être étudiées (dans ce cas-ci la gélatine). La migration des protéines se réalise à 4°C sous la présence d'un

Tableau II.21 : Préparation des échantillons pour le zymogramme – Matériel

Plaques 24 puits (Costar, Corning, USA)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH_2PO_4 (Merck, Germany) / K_2HPO_4 (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Eppendorfs 1,5 ml (Sarstedt, Germany)	
NaOH 0,5N (Merck, Germany)	
Colonnes de concentration des surnageants (Amicon Ultra 3K, Millipore, Ireland)	
Centrifugeuse à 4°C (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Germany)	

Tableau II.22 : Petits et grands zymogrammes – Matériel

Gel séparateur 7,5%	H ₂ O	4,75 ml	19 ml
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Merck, Germany)	2,5 ml	10 ml
	30% Acrylamide/bis (Bio-Rad, USA)	2,5 ml	10 ml
	SDS 10% (MP Biomedicals, USA)	100 µl	400 µl
	Gélatine (from porcine skin, #G2500, Sigma, USA)	100 µl	400 µl
	10% préchauffée à 40°C		
	APS 10% (GE Healthcare, Sweden)	50 µl	200 µl
	TEMED (GE Healthcare, Sweden)	10 µl	40 µl
Gel concentrateur	H ₂ O	6,1 ml	12,2 ml
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (Merck, Germany)	2,5 ml	5 ml
	30% Acrylamide/bis (Bio-Rad, USA)	1,3 ml	2,6 ml
	SDS 10% (MP Biomedicals, USA)	100 µl	200 µl
	APS 10% (GE Healthcare, Sweden)	50 µl	100 µl
	TEMED (GE Healthcare, Sweden)	10 µl	20 µl
Running buffer 5x	0,12 M Tris (Merck, Germany)		
	0,96 M glycine (Merck, Germany)		
	0,017 M SDS (MP Biomedicals, USA)		
Bleu de charge 2x	1,5 g de Tris (120 mM) (Merck, Germany)		
	SDS 4% (MP Biomedicals, USA)		
	4 ml de solution A		
	100 ml d'H ₂ O		
Solution A	0,1 g de bleu de bromophénol (15 mM) (Merck, Germany)		
	8,8 g de sucre (4,9 M)		
	10 ml d'H ₂ O		
Générateur (Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Pharmacia Biotech, USA)			
Triton X-100 2,5% (Merck, Germany)			
Agitateur (Innova 2100, New Brunswick scientific, USA)			
Tampon d'activation	6,06 g de Tris (50 mM) (Merck, Germany)		
	1,47 g de CaCl ₂ (10 mM) (Merck, Germany)		
	2,92 g de NaCl (50 mM) (Merck, Germany)		
	0,5 g de solution de Brij 35 30% (Sigma Diagnostics, USA)		
Bleu de coomassie 0,25% (Serva, Germany)			
Solution de décoloration	87,5% d'H ₂ O		
	7,5% acide acétique (Merck, Germany)		
	5% méthanol (Acros Organics, USA)		
Scanner (ImageScanner, Amersham pharmacia, UMAX, Taiwan)			
Séchage du zymogramme (SLAB Gel Dryer, SE1160, Hoefer Scientific instruments, USA)			
ImageQuantL (GE Healthcare, UK)			

courant électrique. Après la migration, le SDS contenu dans le gel est retiré grâce au Triton X-100 permettant la renaturation des enzymes. Le gel est alors placé dans un tampon d'activation contenant notamment du calcium nécessaire à l'activité des MMPs. Ces enzymes renaturées retrouvent leur activité à l'endroit où elles ont arrêté leur migration. Après l'activation des enzymes et ainsi la digestion du substrat, le gel est coloré au bleu de coomassie et puis décoloré. La décoloration ne se réalise qu'aux endroits où le substrat a été digéré (bandes blanches dans un fond bleu) et donc où des enzymes actives se situent.

11.2. Méthode

a) Obtention des échantillons

Les cellules EAhy926 sont repiquées en plaques 24 puits à une densité de 100 000 cellules par puits. 20h après l'ensemencement, le milieu est remplacé par 1 ml (précisément avec une p1000) de milieu CO₂-indépendant + L-glutamine contenant ou non du TNF- α . Les cellules sont incubées pendant 6h en N, HC ou HI. Après l'incubation, le surnageant de chaque puits est récolté en eppendorf et les cellules sont rincées au PBS et lysées au NaOH 0,5N en vue de réaliser un dosage de Folin pour déterminer la concentration en protéines de chaque puits. La totalité de chaque surnageant est déposée dans des colonnes de concentration qui sont centrifugées à 4°C à une vitesse de 4500 rpm (+/- 2h30). La centrifugation est maintenue jusqu'à atteindre le volume minimal de concentration dans ce type de colonne, c'est-à-dire 30 μ l. Les surnageants sont donc tous concentrés de la même manière, portés au même volume final, et conservés à -70°C (Tableau II.21).

b) Préparation des échantillons pour les petits zymogrammes (pas de normalisation)

Le volume de surnageant chargé sur les petits gels n'a pas été normalisé car ces zymogrammes ont servi à l'identification des bandes observées et non à la comparaison des activités enzymatiques des différents échantillons. Dans ce cas, le volume d'échantillon et le volume de bleu de charge sont dans un rapport 50-50 (par exemple 15 μ l d'échantillon + 15 μ l de bleu de charge).

c) Préparation des échantillons pour les grands zymogrammes (avec normalisation)

Le volume de surnageant chargé sur les grands gels de zymographie est normalisé sur base de la concentration en protéines obtenue par la lyse cellulaire au NaOH 0,5N et déterminée par un dosage de Folin. Cette normalisation permet de corriger, comme pour l'ELISA, les variations engendrées par le nombre de cellules présentes dans chaque puits, et ceci afin de s'assurer que ce que l'on observe est bien dû à un effet de l'incubation et pas à une différence de la quantité cellulaire ou encore de prolifération. Le volume maximal d'échantillon prélevé (sur les 30 μ l récoltés) est de 15 μ l et correspond à l'échantillon ayant la concentration en protéines la plus basse. Un volume inférieur à 15 μ l est alors déterminé pour tous les autres échantillons sur base du rapport entre la concentration protéique la plus basse et la concentration de l'échantillon. Les volumes des échantillons sont alors portés à 15 μ l à l'aide de 0,5 M de Tris-HCl pH 6,8 et 15 μ l de bleu de charge sont ajoutés à chaque échantillon conduisant à un volume de chargement de 30 μ l. Les échantillons sont spinnés 2 minutes à 13 000 rpm et chargés sur les grands gels.

d) Préparation des petits et grands gels contenant de la gélatine (Tableau II.22)

Une fois le montage des plaques réalisé, un gel séparateur 7,5% contenant de la gélatine est préparé, coulé jusqu'à 0,5-1 cm en dessous du peigne et recouvert d'isobutanol. Après 45 minutes de polymérisation à température ambiante, l'isobutanol est retiré et le dessus du gel est abondamment rincé à l'eau, elle-même complètement éliminée à l'aide d'un papier

Tableau II.23 : Identification des enzymes responsables de la dégradation de la gélatine sur le zymogramme via l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques ou via l'utilisation d'un spectromètre de masse – Matériel

	Concentrations
EDTA (Merck, Germany)	20 mM
Inhibiteur MMP-2 ; concentration stock : 20 mM (#444244, Calbiochem, USA)	200 µM, 2 mM, 1 mM
Inhibiteur MMP-9 ; concentration stock : 1 mM (#444278, Calbiochem, USA)	20 µM, 2 µM, 10 µM
Inhibiteur MMP-2/MMP-9 ; concentration stock : 1 mM (#44249, Calbiochem, USA)	25 µM, 100 µM
Inhibiteur MMP-8 ; concentration stock : 2,76 mM (#444237, Calbiochem, USA)	10 µM, 40 µM, 200 µM
Inibiteur MMP-13 ; concentration stock : 1 mM (#444283, Calbiochem, USA)	20 µM
N-Ethylmaleimide (NEM) (Thermo Scientific, USA)	5 mM
Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)	1 mM
Pepstatine A ; concentration stock : 10 mM (#26305-03-3, Sigma, USA)	0,5 mM
Spectromètre de masse EIS-TOF : maXis (HR-TOF) Bruker (Bremen, Germany)	

Whatman. Le gel concentrateur est ensuite coulé au dessus du gel séparateur et un peigne (soit 20 puits de 1,5 mm pour les grands gels ou soit 10 puits de 1 mm pour les petits gels) formant les puits de chargement est placé. Après 45 minutes de polymérisation, le peigne est enlevé et les puits sont rincés avec du tampon d'électrophorèse 1X.

- Pour le petit gel, le fond du support est déclipé et le gel est placé dans la cuve de migration dans laquelle 1L de tampon d'électrophorèse 1X est ajouté. Les puits sont alors chargés avec 10 µl d'étalon de poids moléculaire ou 20 µl d'échantillon. Une fois les échantillons chargés, la cuve est placée dans un bac de glace et la migration s'effectue pendant 3 heures à 85 V. Le faible voltage permet de réduire au minimum le nombre de watts et ainsi d'éviter l'échauffement lors de la migration. Le bac de glace permet de maintenir une température de migration de 4°C, nécessaire pour maintenir l'intégrité du gel contenant de la gélatine et d'assurer la reprise de l'activité enzymatique.
- Pour le grand gel, les échantillons sont chargés avec 20 µl d'étalon de poids moléculaire ou 30 µl d'échantillon. Ensuite, les plaques sont décrochées du support portatif et accrochées au support avec l'électrode. Un barreau magnétique est placé dans le fond de la cuve ainsi que 4L de tampon d'électrophorèse 1X. La cuve est placée dans un bassin contenant de l'eau et de la glace, lui-même déposé sur un aimant pour faire tourner le barreau magnétique, permettant la circulation du froid dans toute la cuve. La circulation interne est également enclenchée avec de l'eau à 4°C passant dans les tubes à l'intérieur de la cuve. La migration s'effectue pendant 7h30 à 120 V.

Une fois la migration finie, le gel est placé 1h sur un agitateur à température ambiante dans une solution de Triton X-100 à 2,5% ce qui permet de retirer le SDS. Le gel est ensuite incubé pendant 20h en chambre chaude (37°C) sur un agitateur dans du tampon d'activation contenant notamment du calcium nécessaire à l'activité des MMPs. Après les 20h d'activation, le gel est coloré au bleu de Coomassie 0,25% pendant 1h et décoloré dans de l'acide acétique 7,5% - méthanol 5% pendant 1h30. Le gel est ensuite mis dans de l'eau pour le scanner, placé dans du glycérol 5% pendant 30 minutes et ensuite séché. Il peut également être conservé dans de l'eau dans la chambre froide pendant plusieurs jours. La quantification des bandes se réalise avec le programme ImageQuantL.

12) Identification des protéases observées sur le zymogramme

12.1. Utilisation d'inhibiteurs

Les enzymes pouvant être détectées sur un zymogramme avec comme substrat la gélatine sont les MMPs de type gélatinase. Néanmoins, la gélatine utilisée est en fait un mélange hétérogène de peptides solubles dans l'eau ayant un haut poids moléculaire et provenant du collagène. Dès lors, d'autres types de MMPs (collagénases,...) ainsi que certaines sérine protéases telles que l'uPA, le tPA et la plasmine peuvent aussi être détectées. Pour arriver à identifier les enzymes digérant la gélatine, des inhibiteurs ont été ajoutés dans le tampon d'activation. Ceux-ci, en bloquant l'activité de certaines enzymes de façon plus ou moins spécifique, sont responsables de la non-apparition des bandes observées sur le gel. Tout d'abord, de l'EDTA, empêchant l'activité des MMPs en chélatant les cations comme le zinc et le calcium, a été rajouté dans le tampon d'activation. Ensuite, des inhibiteurs spécifiques des MMPs de type gélatinase, MMP-2 et MMP-9, et des inhibiteurs spécifiques de MMPs de type collagénase, MMP- 8 et MMP-13, ont été utilisés. Des inhibiteurs d'autres types de protéases que les MMPs ont également été testés afin de s'assurer de la nature des enzymes observées sur le zymogramme : le PMSF (inhibiteur des sérine protéases), le NEM (inhibiteur des cystéinyl protéases) et la pepstatine A (inhibiteur des aspartyl protéases) (Tableau II.23).

Tableau II.24 : Coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse – Matériel

Fixation (20 min)	50% de méthanol (Acros Organics, USA) (150 ml) 5% d'acide acétique (Merck, Germany) (15 ml) 45% d'eau (135 ml)
Lavage au méthanol (10 min)	50% de méthanol (Acros Organics, USA) (150 ml) 50% d'eau (150 ml)
Lavage à l'eau (toute la nuit ou 2 h)	
Augmentation de la sensibilité (1 min)	0,02% de thiosulfate de sodium (Merck, Germany) (60 mg) eau (300 ml)
Lavage à l'eau (2x 1 min)	
Marquage à l'argent	0,1% de nitrate d'argent (Merck, Germany) (0,3 g) eau (300 ml)
Lavage à l'eau (2x 1 min)	
Révélation (TRES rapide < 5 min)	0,04% de formaldéhyde (Sigma, USA) (240 µl) 2% de carbonate de sodium (Merck, Germany) (12 g) eau (600 ml)
Arrêt de la révélation	5% d'acide acétique (Merck, Germany) (30 ml) eau (570 ml)

Tableau II.25: Test de migration par la technique du « Scratch assay » - Matériel

Boîtes de culture de 25 cm ² (T25 ; Costar, Corning, USA)	
PBS non stérile (Phosphate Buffer Saline)	10 mM de tampon phosphate KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany) / K ₂ HPO ₄ (Merck, Germany) 0,5 M pH 7,4 150 mM NaCl (Merck, Germany)
Racloir (TPP, Switzerland) taillé en pointe	
Microscope à contraste de phase (Leitz, Labovet FS GMBH, Germany) couplé à un appareil photo (DFC290, Leica, Microsystems, Germany)	

12.2. Utilisation de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (nanoLC-MSMS) a été utilisée dans le but d'identifier les enzymes inconnues révélées sur les zymogrammes. Cette technique ne peut se réaliser directement à partir d'un zymogramme car la gélatine, tellement abondante, rend l'identification d'autres protéines impossible. Le surnageant des cellules a alors été chargé sur un mini-gel SDS-PAGE classique contenant 7,5% d'acrylamide afin de comparer le profil de migration avec celui du zymogramme. Dès lors, le même échantillon a été chargé sur les deux types de gel. Les morceaux de gel contenant les protéines à identifier sont directement découpés après coloration à l'argent à l'aide d'une méthode compatible avec la spectrométrie de masse (Tableau II.24). Les protéines se trouvant dans les bandes découpées sont ensuite digérées par de la trypsine directement au sein du gel (digestion « in-gel »). L'ensemble des peptides résultant de la digestion protéique est ensuite séparé en chromatographie liquide (nanoLC) sur une colonne en phase inverse de 18C (Tableau II.23). Les peptides séparés suivant leur hydrophobicité sont ensuite ionisés dans la source du spectromètre de masse de type EIS (ionisation par électrospray). Un premier spectre de masse (MS) permet au logiciel de sélectionner les peptides qui seront séquencés. Lors du séquençage, les peptides multichargés (2+ et 3+) sont isolés et fragmentés dans la cellule de collision du spectromètre. L'ensemble des fragments est alors séparé dans l'analyseur à temps de vol (TOF) selon leur rapport masse sur charge afin d'obtenir le spectre MS/MS. Les données brutes provenant du spectromètre sont ensuite traitées par le logiciel d'analyse protéomique « Protein Scape » qui utilise le moteur de recherche « Mascot » afin d'identifier les protéines présentes dans les bandes découpées du gel SDS-PAGE.

13) Test de migration des cellules (Scratch assay)

Les cellules endothéliales sont repiquées à une densité de 5.10^6 cellules par T25. 20h après l'ensemencement, 5 scratches sont réalisés dans le tapis cellulaire confluent à l'aide d'un racloir taillé en pointe. Les cellules sont rincées deux fois au PBS pour retirer toutes celles décrochées et 5 ml de milieu CO₂-indépendant contenant de la L-glutamine sont ajoutés dans chaque T25. Des photos en contraste de phase à l'aide d'un microscope couplé à un appareil photo sont prises pour illustrer le temps « 0 ». Les cellules sont ensuite incubées en N, HC, HI en présence ou non de TNF- α . Après les 6h d'incubation, des photos de ces mêmes scratches sont à nouveau prises. La migration est alors évaluée sur base du nombre de cellules se retrouvant à l'intérieur des scratches (Tableau II.25).

14) Analyses statistiques

Les données expérimentales ont été analysées par une ANOVA 2 et la méthode de Holm-Sidak à l'aide du programme statistique SigmaStat V.3.11. Les données sont considérées comme statistiquement significatives à partir d'une valeur de p inférieure à 0,05.

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001
\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001
p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

* HC/HI vs N correspondant \$ HI vs HC correspondant # TNF- α vs CTL pour la même pO ₂
--

Modèle d'étude

Afin d'étudier les effets de l'hypoxie intermittente associée à un environnement inflammatoire sur les cellules endothéliales, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'expression en ARNm d'un certain nombre de gènes impliqués dans l'installation d'un phénotype inflammatoire et/ou angiogénique. Certains gènes dont l'expression varie en hypoxie intermittente ont alors été étudiés plus en profondeur. La deuxième approche a été d'évaluer l'activité d'enzymes sécrétées dans le milieu cellulaire, capables de dégrader la MEC ; étape essentielle à la migration des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. La troisième approche a finalement été d'investiguer les effets de l'hypoxie intermittente et du microenvironnement inflammatoire sur la migration des cellules endothéliales.

Au cours de ce mémoire, les cellules EAhy926 ont été utilisées comme modèle cellulaire pour l'ensemble des approches envisagées. Cette lignée cellulaire permanente est dérivée de la fusion entre des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des cellules cancéreuses provenant d'un carcinome de poumon humain (A549) rendant la lignée immortelle. Cette lignée présente la plupart des fonctions d'un endothélium vasculaire différencié dont l'expression, avec la même distribution morphologique que dans les cellules endothéliales primaires de l'antigène lié au facteur VIII (VIII:Ag) impliqué dans l'agrégation des plaquettes et spécifique aux cellules endothéliales et mégacaryocytaires (Edgell et al., 1983). De plus, ces cellules présentent des corps de Weibel-Palade fonctionnels. En effet, ils contiennent des multimères du facteur de Von Willebrand pouvant être rapidement relargués. Ces corps ne sont retrouvés que dans les cellules endothéliales vasculaires (Edgell et al., 1990). Il a également été montré que ces cellules conservent l'expression de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) retrouvée dans la lignée primaire (HUVEC) (Ahn et al., 1995) et expriment et relarguent donc l'endothéline-1 (ET-1) (Saijonmaa et al., 1991). Elles semblent aussi constituer un modèle intéressant pour l'étude des processus angiogéniques par leur capacité à se réorganiser en structures tubulaires au sein d'une matrice extracellulaire *in vitro* (Bauer et al., 1992). En ce qui concerne la pertinence d'un modèle immortel, il est maintenant connu que des cellules cancéreuses peuvent fusionner spontanément avec des cellules endothéliales pour former des cellules hybrides *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les cellules cancéreuses acquièrent certains marqueurs des cellules endothéliales impliqués dans la promotion de l'invasion tumorale et la formation de métastases en facilitant, par exemple, l'échappement à la surveillance immunitaire alors que des protéases continuent à être produites, protéases capables de dégrader la membrane basale vasculaire (Mortensen et al., 2004). Dès lors, des études sur ce type de cellules hybrides peuvent aider à la compréhension de l'angiogenèse tumorale, de l'invasion des cellules tumorales et de la formation de métastases. De plus, l'utilisation courante de cette lignée au sein de la littérature internationale fait de celle-ci un modèle bien caractérisé (temps de doublement connu (Lu et al., 2009), ...). En outre, son avantage considérable est qu'elle constitue une source continue et économique de matériel cellulaire homogène, sans variations entre les lots facilitant la reproductibilité des résultats (Edgell et al., 1983). Pour finir, au laboratoire, Sébastien Toffoli a confirmé que les effets pro-angiogéniques de l'HI mis en évidence sur les cellules EAhy926 étaient également observés sur les cellules primaires (HUVEC) (Toffoli et al., 2009).

Comme l'a décrit Dewhirst, l'hypoxie intermittente présente au sein d'une tumeur se déroule selon deux échelles de temps : des fluctuations journalières résultant de l'angiogenèse proprement dite ainsi que du remodelage de ce réseau vasculaire néoformé, et des fluctuations au cours des heures (une à trois fois par heure) venant de l'instabilité du flux sanguin dans ce

réseau vasculaire. Les fluctuations de pO_2 touchent les cellules tumorales ainsi que les cellules endothéliales (Dewhirst, 2007). C'est à la dernière échelle de temps c'est-à-dire les fluctuations au cours des heures que nous nous sommes intéressés. Pour déterminer la durée des cycles effectués, nous nous sommes basés sur des résultats obtenus par Martinive et al. et Toffoli et al. montrant qu'une hypoxie d'une heure est suffisante pour induire une stabilisation importante de HIF-1 α et qu'une réoxygénation de 30 minutes permet sa dégradation complète (Martinive et al., 2006; Toffoli et al., 2007). Ce sont donc ces durées d'hypoxie et de réoxygénation qui ont été choisies pour notre recherche.

Afin de mimer au mieux les conditions inflammatoires d'une manière suffisamment simple et efficace pour une première approche de ce sujet, nous avons choisi d'incuber les cellules en présence de TNF- α . Ce facteur est considéré comme le médiateur principal de l'inflammation chronique détectée au niveau du site tumoral. Une concentration de 0,1 ng/ml a été choisie ; celle-ci étant proche de la concentration physiologique retrouvée dans un site d'inflammation chronique tumorale puisqu'une telle concentration a été détectée *in vivo* dans le cancer colorectal (Takagi et al., 1998). Une autre étude a également montré, cette fois *in vitro*, que des neutrophiles stimulés au LPS sécrètent de 160 à 190 pg/ml de TNF- α (Dubravec et al., 1990). De plus, nous avons préalablement vérifié dans notre modèle cellulaire que le TNF- α à 0,1 ng/ml était capable d'activer les cellules endothéliales EAhy926. Pour cela, l'activité de liaison de la sous-unité p65 à une séquence κB a été évaluée par TransAM après 6h d'incubation en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à deux concentrations différentes : 0,1 ng/ml et 1 ng/ml. Une forte augmentation de l'activité de liaison à l'ADN est induite par le TNF- α mais les deux concentrations utilisées induisent approximativement la même activité de liaison de p65 à l'ADN (Annexe 1). Ce résultat indique donc que 0,1 ng/ml est une concentration suffisante pour induire l'activation du facteur de transcription NF- κB .

1ère partie : Etude des variations d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et/ou l'angiogenèse

▪ Etude des variations d'expression en ARNm

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à toute une série de gènes exprimés par les cellules endothéliales et impliqués dans l'inflammation et/ou l'angiogenèse. Les gènes cibles de cette étude ont été séparés en quatre grands groupes : cytokines, facteurs de croissance, gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage matriciel, et autres. Pour l'étude des variations d'expression génique, l'extraction des ARN a été effectuée à deux temps différents c'est-à-dire directement après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR). Les variations d'expression en ARNm ont ensuite été mesurées par PCR en temps réel sur les ADNc. L'utilisation de ces deux temps permet d'augmenter l'information en fournissant un aperçu de la cinétique de l'expression d'un même gène. Ainsi, sur l'ensemble des gènes étudiés, ces deux temps donnent une idée de ceux régulés de manière précoce (6h+0hR) et de ceux dont l'expression est modifiée plus tardivement (6h+4hR), par exemple, par d'autres gènes activés antérieurement (tels que l'IL-8 qui entraîne l'activation de nombreuses cascades de signalisation (Annexe 2)). Par ailleurs, les gènes étudiés ne sont pas régulés de la même façon au niveau transcriptionnel (facteurs de transcription différents) et au niveau post-transcriptionnel (miRNAs, dégradation, ...), ce qui peut expliquer les différences de profil d'expression. Des effets différents de l'HC et de l'HI sont également attendus. En effet, les phases de réoxygénation entrecoupant les périodes d'hypoxie lors d'une HI, comme expliqué dans le point I.2.3.f, génèrent des ROS modulant

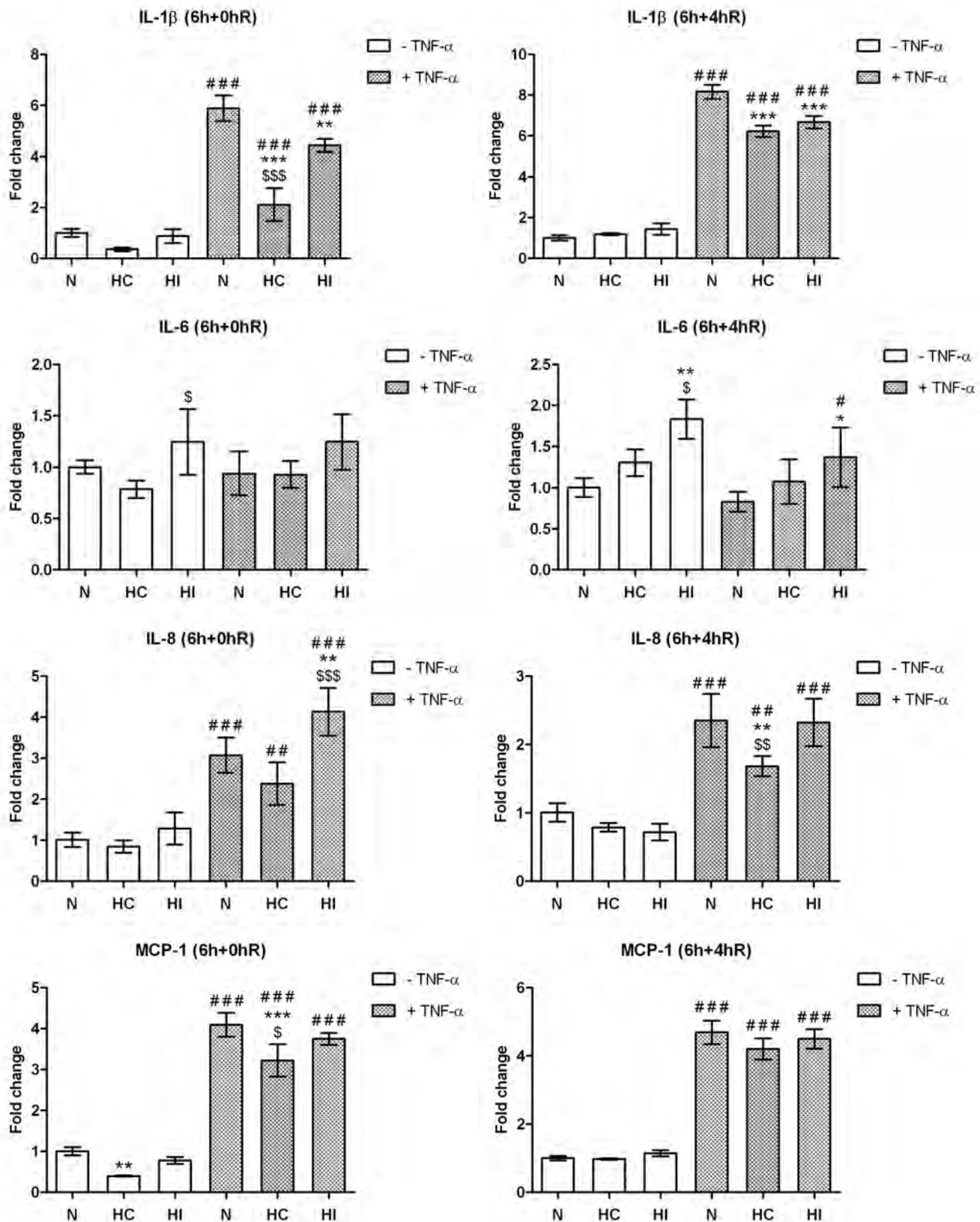


Figure III.1 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de cytokines à 6h+0hR et à 6h+4hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR), l'ARN est extrait et rétro-transcrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct de RPL13A (HKG). Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport à la condition contrôle (N) (moyenne \pm 1 écart-type). L'expérience a été réalisée sur trois extraits différents. Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$
 \$ HI vs HC correspondant \$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$
 # TNF- α vs CTL pour la même pO_2 # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

l'expression de gènes via l'activation d'AP-1 et de NF- κ B alors que l'hypoxie par elle-même active majoritairement le facteur HIF-1 (Karin et al., 2002; Matthews et al., 2007). De surcroît, les deux facteurs AP-1 et NF- κ B sont également activés par le TNF- α , suggérant que les effets de l'HI et du TNF- α peuvent s'additionner, voire même s'amplifier. Une autre différence entre l'HC et l'HI a été soulignée par Moeller et al. montrant que les transcrits régulés par HIF-1 sont gardés non traduits dans des granules de stress pendant les périodes d'hypoxie à cause de la limitation des ressources énergétiques et que leur libération a lieu pendant les périodes de réoxygénation durant lesquelles l'ATP est à nouveau produit en grande quantité permettant ainsi leur traduction (Moeller et al., 2004). Dès lors, les périodes de réoxygénation induisent l'activation d'autres facteurs de transcription ainsi que l'exécution d'un programme adaptatif initié pendant l'hypoxie.

1) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de cytokines

L'expression de transcrits codant pour certaines cytokines a été étudiée en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α (Figure III.1). De manière générale, à 6h+0hR, le TNF- α augmente significativement l'expression génique de l'IL-1 β , de l'IL-8 et de MCP-1 mais pas celle de l'IL-6. A 6h+4hR, l'augmentation d'expression induite par le TNF- α est maintenue même si elle est un peu plus faible pour l'IL-8 et MCP-1, et un petit peu plus forte pour l'IL-1 β . Cette dernière cytokine, en présence de TNF- α , montre des niveaux d'expression génique significativement plus faible en HC et en HI par rapport à la N à 6h+0hR et 6h+4hR. L'expression de MCP-1 ne montre pas non plus de variations intéressantes puisque son expression n'est quasiment pas modifiée en fonction de la pO₂ avec seulement une petite diminution de son expression en HC à 6h+0hR en présence et en absence de TNF- α . Au contraire de l'IL-1 β et de MCP-1, l'expression génique de l'IL-6 montre des variations très intéressantes. En effet, son expression est significativement augmentée en HI seule par rapport à l'HC à 6h+0hR. Elle est également significativement augmentée en HI seule par rapport à la N et l'HC et en HI en présence de TNF- α par rapport à la N à 6h+4hR. Ces observations suggèrent donc que ce gène est régulé positivement par l'HI alors que le TNF- α ne régule pas son expression génique. Comme pour l'IL-6, l'expression génique de l'IL-8 montre des variations intéressantes. En effet, en présence de TNF- α , son expression est fortement augmentée en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR. Cette augmentation n'est plus retrouvée à 6h+4hR suggérant que ce gène est régulé rapidement par l'HI et le TNF- α . On peut également noter que trois gènes sur quatre (IL-1 β , IL-8, MCP-1) voient leur expression diminuer en HC par rapport à la N, en présence ou en absence de TNF- α à 6h+0hR ou à 6h+4hR ; diminution uniquement retrouvée pour l'IL-1 β en HI. Ceci souligne d'une part les effets différents induits par les deux types d'hypoxie, et reflète d'autre part l'adaptation des cellules à l'hypoxie par la diminution de la synthèse en ARNm.

En conclusion, l'IL-6 et l'IL-8 présentent des variations d'expression génique intéressantes. En effet, l'expression en ARNm de l'IL-6 est augmentée en HI à 6h+0hR et davantage à 6h+4hR indépendamment du TNF- α . L'expression génique de l'IL-8 est, quant à elle, augmentée significativement en présence de TNF- α en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR. Les variations d'expression au niveau protéique de ces deux gènes ont donc été étudiées dans la suite du travail.

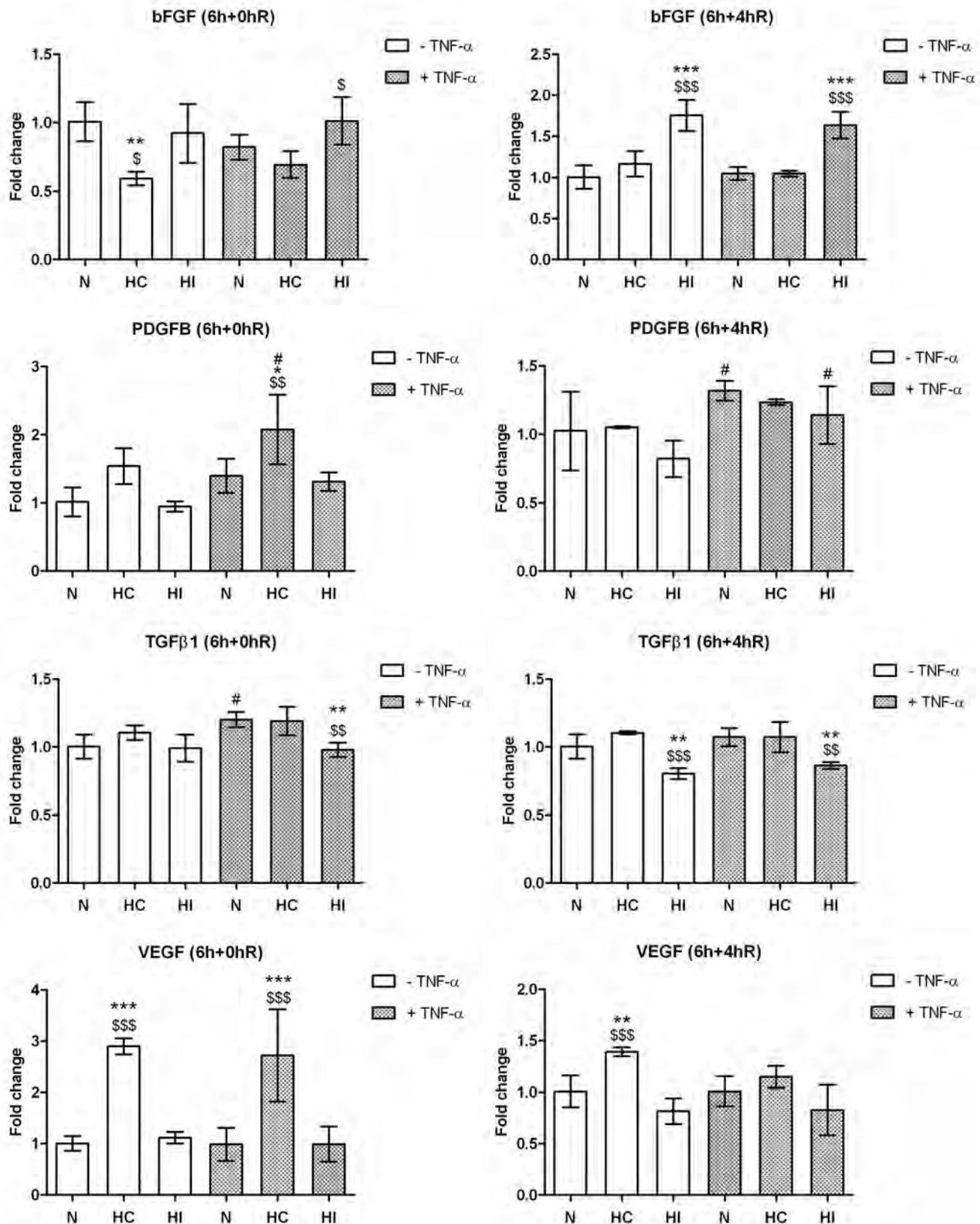


Figure III.2 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF-α sur l'expression en ARNm de facteurs de croissance à 6h+0hR et à 6h+4hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF-α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR), l'ARN est extrait et rétro-transcrit. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct de RPL13A (HKG). Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport à la condition contrôle (N) (moyenne ± 1 écart-type). L'expérience a été réalisée sur trois extraits différents. Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

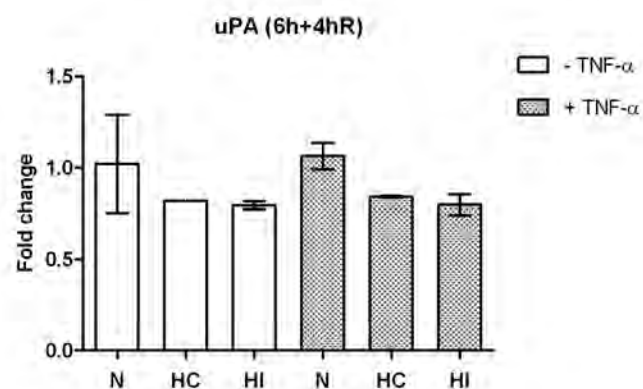
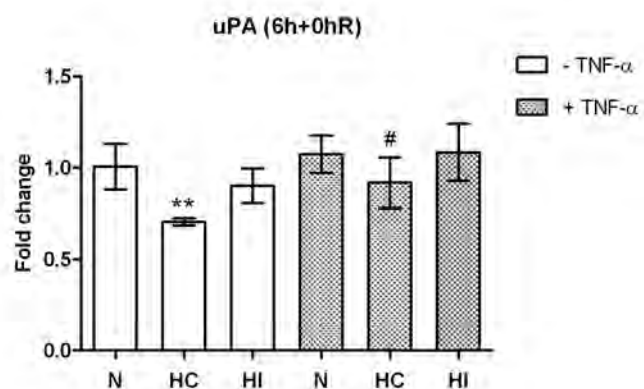
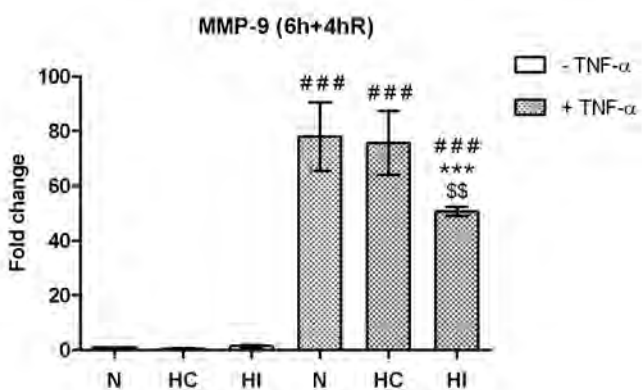
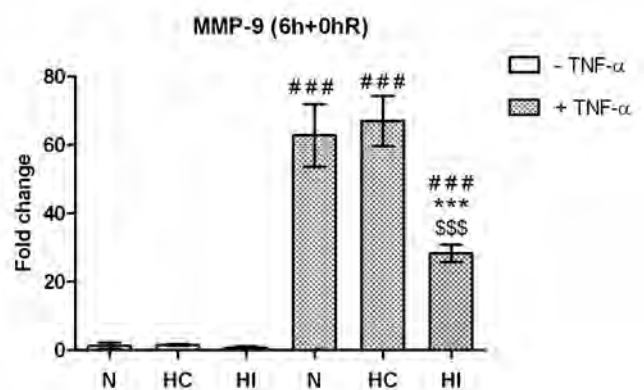
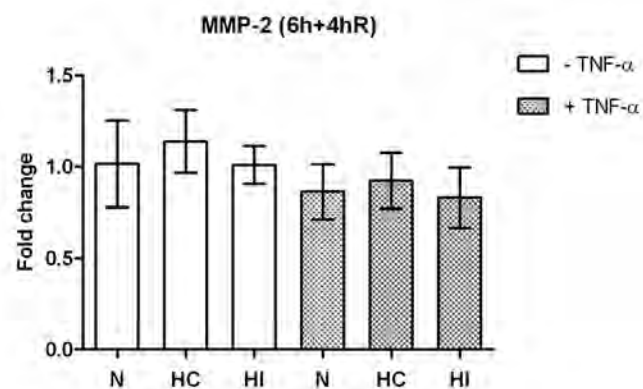
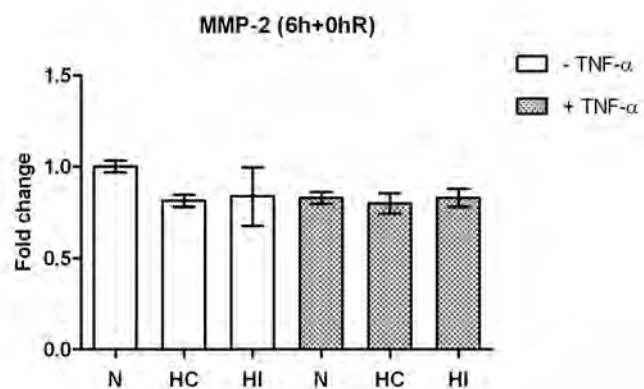
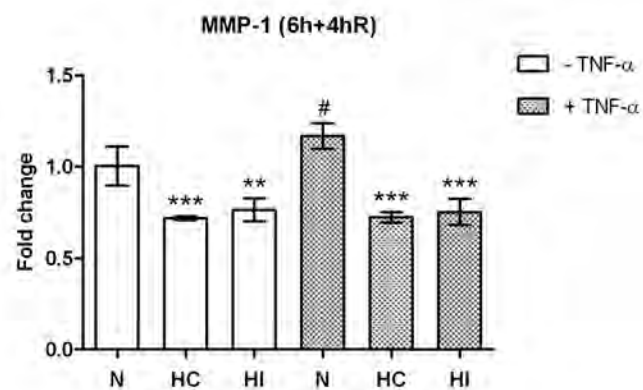
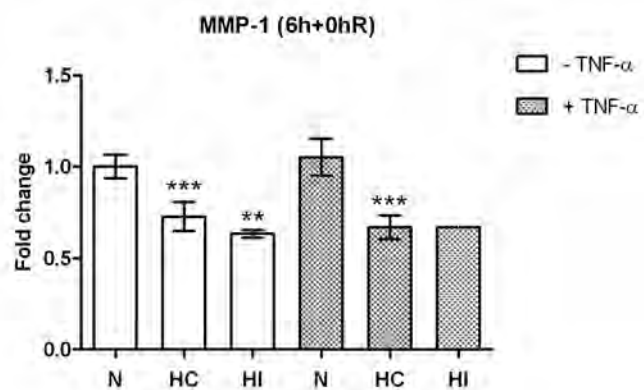
* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF-α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001



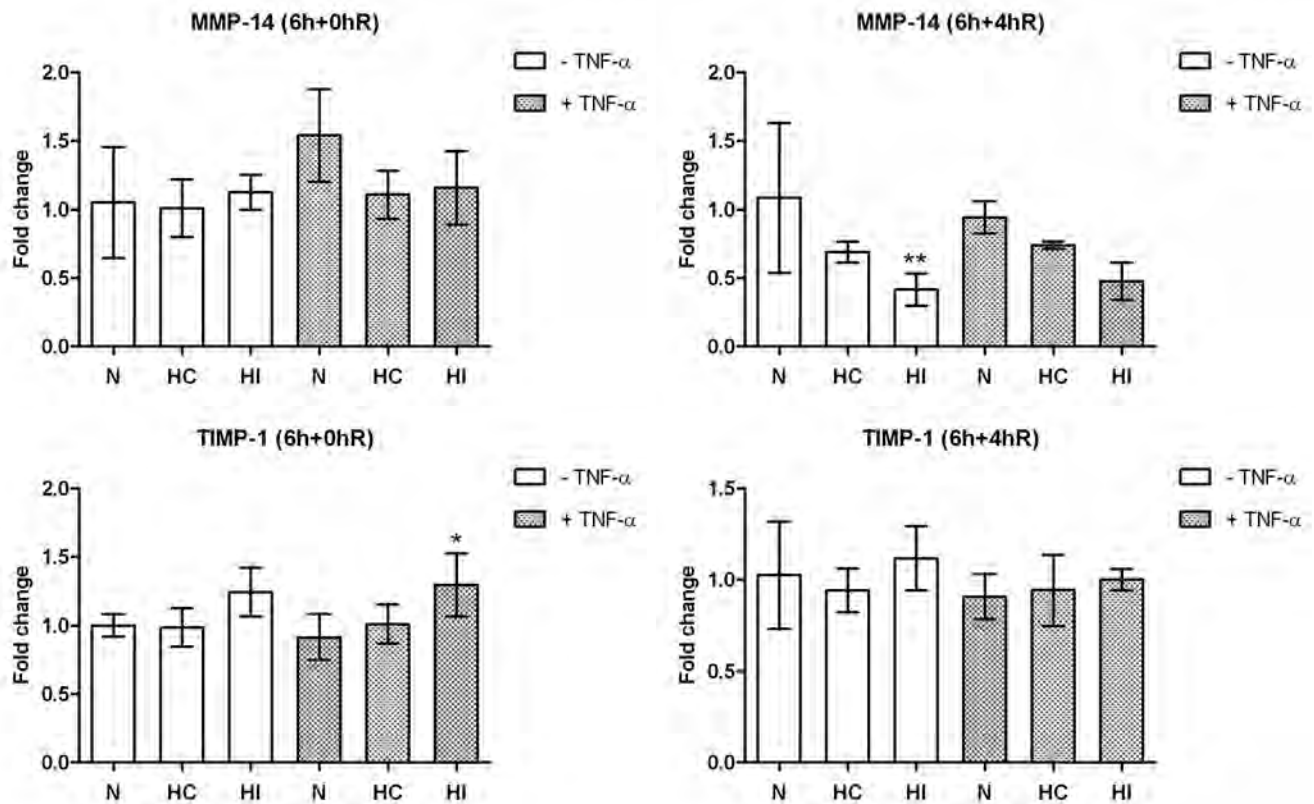


Figure III.3 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de gènes impliqués dans le remodelage matriciel à 6h+0hR et à 6h+4hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR), l'ARN est extrait et rétro-transcrit. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct de RPL13A (HKG). Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport à la condition contrôle (N) (moyenne \pm 1 écart-type). L'expérience a été réalisée sur trois extraits différents. Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant * p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant \$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂ # p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

Remarque : MMP-1 6h+0hR : problème de rétro-transcription pour un échantillon HI+TNF- α (n=2)

uPA 6h+4hR : problème de rétro-transcription pour un échantillon HC-TNF- α (n=2)

2) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de facteurs de croissance

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression génique de facteurs de croissance en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α (Figure III.2). Parmi les facteurs étudiés, seul le PDGFB (et faiblement le TGF β 1 en N à 6h+0hR) semble voir son expression en ARNm augmenter légèrement en présence de TNF- α . Les autres facteurs de croissance ne répondent pas à sa présence. Au contraire de ce qu'on avait observé pour les cytokines (où trois gènes sur quatre présentaient une expression en ARNm diminuée en HC par rapport à la N), l'HC ne semble pas diminuer l'expression des facteurs de croissance (à part pour le bFGF à 6h+0hR) par rapport à la N. Elle augmente même légèrement l'expression du PDGFB à 6h+0hR en présence de TNF- α par rapport à la N et l'HI ainsi que très fortement l'expression du VEGF à 6h+0hR indépendamment du TNF- α . L'HI, elle, présente des effets différents pour chaque facteur de croissance. En effet, l'HI induit une diminution significative de l'expression du TGF β 1 par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR en présence de TNF- α et à 6h+4hR indépendamment du TNF- α tandis qu'elle induit une augmentation significative de l'expression du bFGF à 6h+4hR par rapport à la N et l'HC.

En conclusion, le bFGF présente une expression génique augmentée en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+4hR. L'expression protéique de ce facteur constitue donc une des directions étudiées par la suite.

3) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de gènes impliqués dans le remodelage matriciel

Après les cytokines et les facteurs de croissance, un autre groupe de gènes également très important pour la progression tumorale est celui des gènes impliqués dans le remodelage matriciel. L'expression de ces gènes a été étudiée en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α (Figure III.3). De manière générale, le TNF- α n'entraîne pas de variations d'expression en ARNm des gènes étudiés, excepté pour MMP-9 qui présente une expression génique très fortement augmentée par le TNF- α . MMP-2, uPA, MMP-14 et TIMP-1 ne montrent pas de variations de leur expression génique. Dès lors, seules les expressions géniques de MMP-1 et MMP-9 vont être discutées. Tout d'abord pour MMP-1, son expression génique est diminuée par les deux types d'hypoxie à 6h+0hR et à 6h+4hR par rapport à la N. De plus, le profil d'expression génique quasiment identique entre les deux temps permet de valider la reproductibilité des résultats et d'accorder une certaine confiance aux variations d'expression génique observées. Concernant MMP-9, une forte diminution de l'expression génique induite par le TNF- α est observée en HI par rapport à la N et l'HC surtout à 6h+0hR et est un peu plus faible à 6h+4hR. Cette diminution de plus de la moitié à 6h+0hR est interpellante et nous a fait penser à une régulation post-transcriptionnelle de ce gène par des miRNAs. En menant des recherches, il s'est avéré que cette diminution pourrait éventuellement être expliquée par la présence de miRNAs ciblant MMP-9. En effet, Ucar et al. viennent juste de montrer que miR-212 et miR-132 sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression de MMP-9 chez la souris (Ucar et al., 2010). Néanmoins, ils ne précisent pas si ces miRNAs jouent sur la dégradation de l'ARNm ou l'inhibition de sa traduction. Il serait alors intéressant d'étudier l'expression de ces deux miRNAs dans les différentes conditions afin de savoir si elle ne serait pas augmentée en HI avec TNF- α . L'abondance des transcrits de MMP-3 a également été mesurée mais quasiment aucun ARNm n'a pu être détecté (données non montrées).

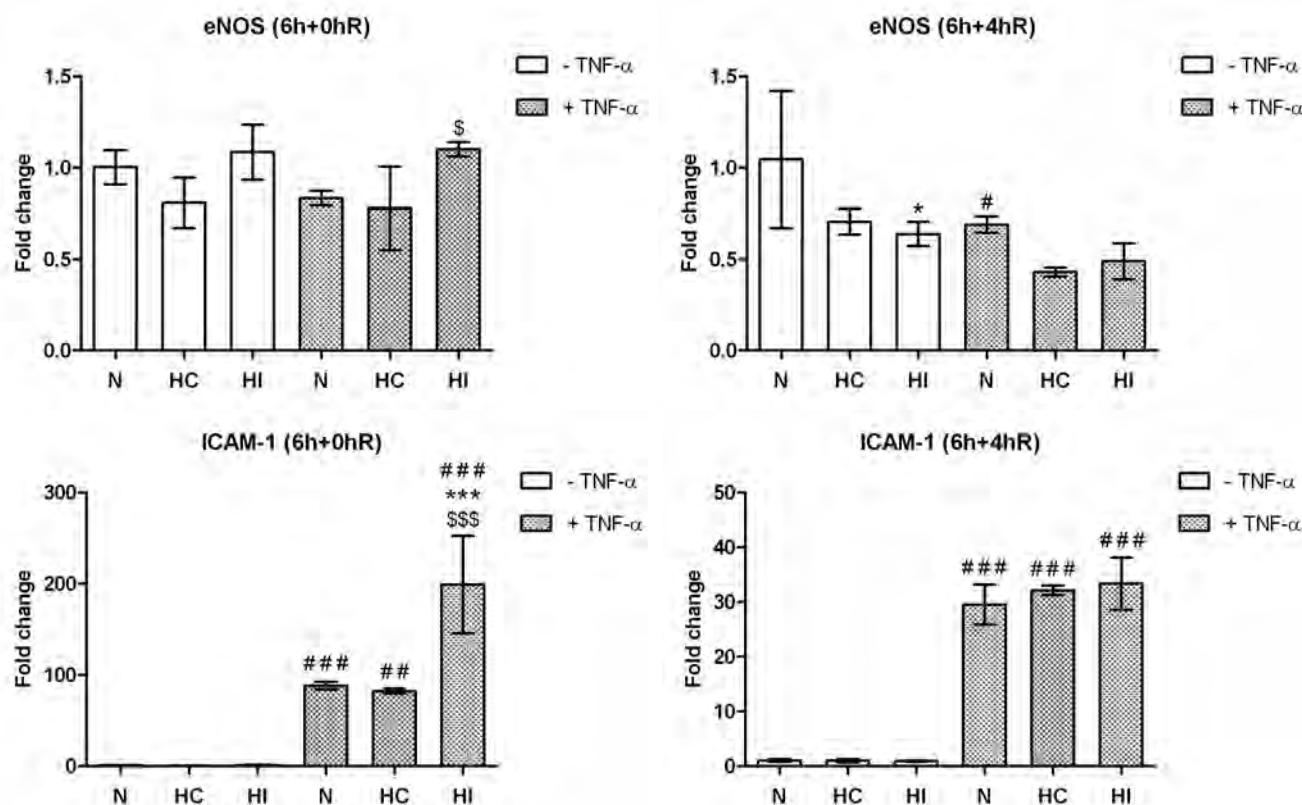


Figure III.4 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de eNOS et ICAM-1 à 6h+0hR et à 6h+4hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR), l'ARN est extrait et rétro-transcrit. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct de RPL13A (HKG). Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport à la condition contrôle (N) (moyenne \pm 1 écart-type). L'expérience a été réalisée sur trois extraits différents. Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

\$ HI vs HC correspondant

\$ $p < 0,05$; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$

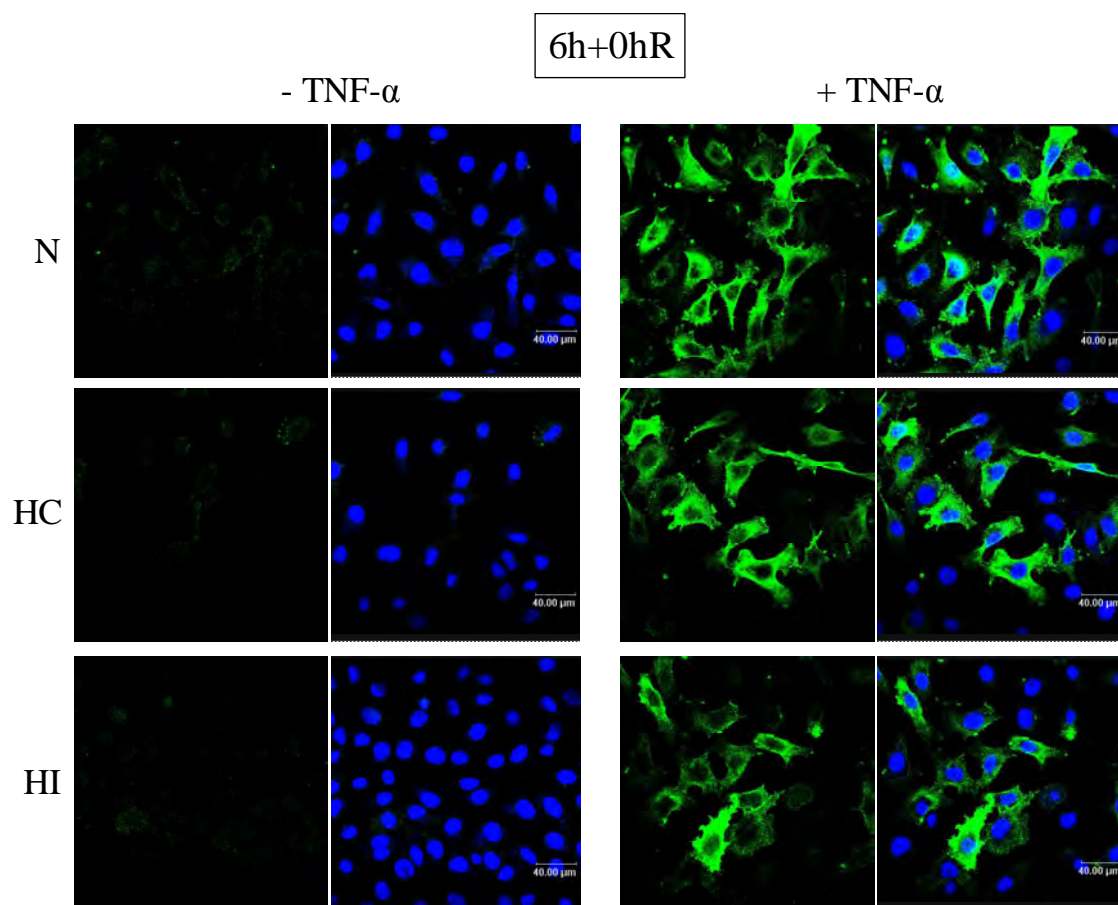


Figure III.5 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression de la protéine ICAM-1 à 6h+0hR.

Les cellules ont été incubées 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR), les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps primaire spécifique pour ICAM-1 et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa 488. Le noyau a également été marqué par l'agent intercalant TOPRO-3. Le marquage en immunofluorescence est ensuite observé à l'aide d'un microscope confocal utilisant un photomultiplicateur constant. Le marquage bleu représente les noyaux tandis que le marquage vert représente ICAM-1.

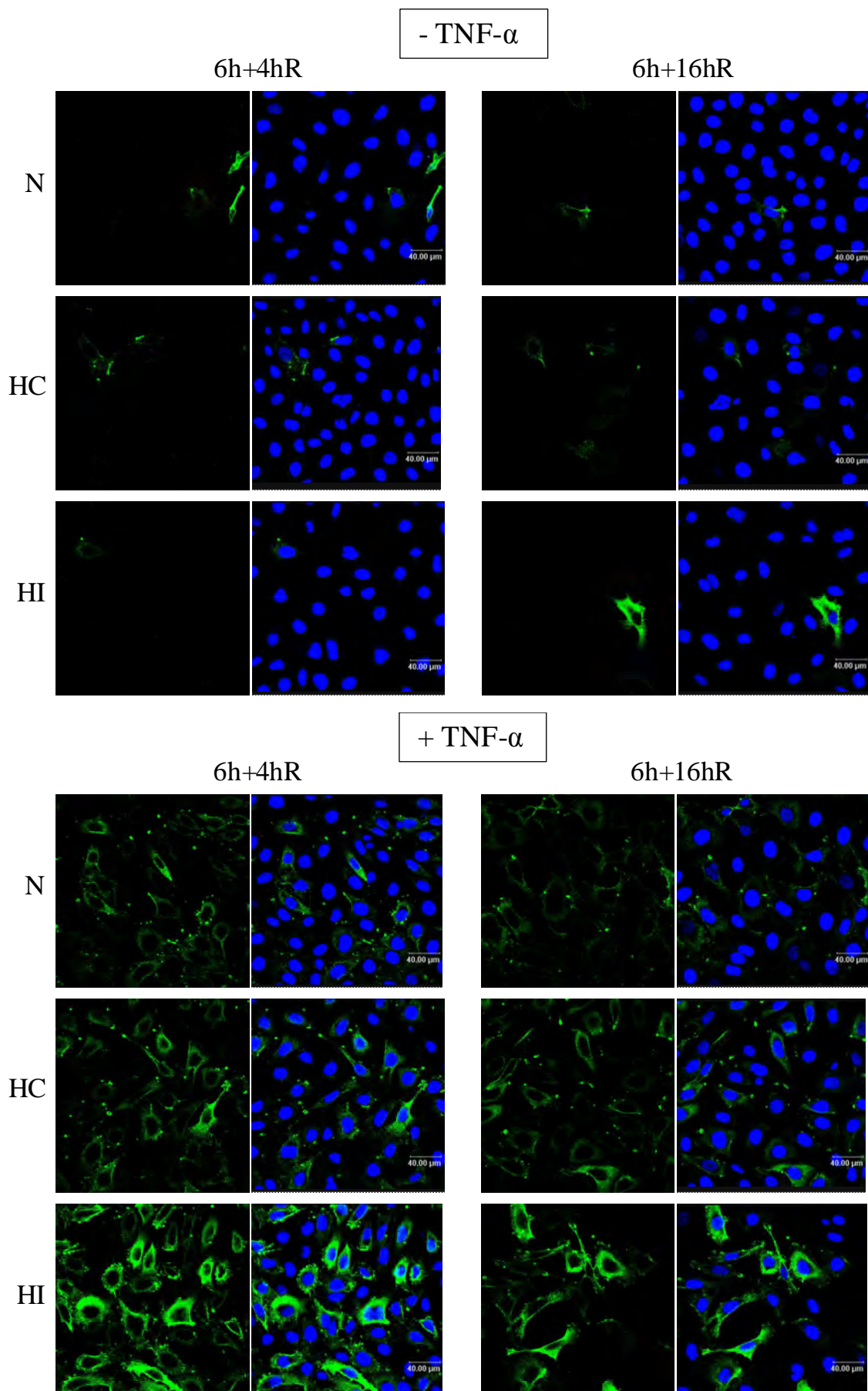


Figure III.6 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression de la protéine ICAM-1 à 6h+4hR et à 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation suivies de 4h (6h+4hR) ou de 16h (6h+16hR) de réoxygénation, les cellules ont été fixées et marquées avec un anticorps primaire spécifique pour ICAM-1 et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa 488. Le noyau a également été marqué par l'agent intercalant TOPRO-3. Le marquage en immunofluorescence est ensuite observé à l'aide d'un microscope confocal utilisant un photomultiplicateur constant. Le marquage bleu représente les noyaux tandis que le marquage vert représente ICAM-1.

En conclusion, aucun des gènes étudiés encodant des protéines impliquées dans le remodelage matriciel ne présente une variation intéressante de son expression génique en HI en présence ou non de TNF- α .

4) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression en ARNm de eNOS et ICAM-1

L'expression génique de eNOS et ICAM-1, deux gènes typiquement exprimés dans les cellules endothéliales, a été étudiée en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α (Figure III.4). Le TNF- α n'induit pas l'expression de eNOS au contraire de celle de ICAM-1, fortement augmentée par ce facteur. L'expression génique de eNOS ne montre pas de variations très intéressantes en fonction de la pO₂, ce qui n'est pas le cas de ICAM-1. En effet, l'HI augmente fortement l'expression génique de ICAM-1 induite par le TNF- α par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR ; ceci suggère un effet synergique de l'HI et du TNF- α . Parallèlement à ICAM-1, l'expression génique de VCAM-1 n'a pas pu être étudiée pour cause de non-expression de ce gène par les cellules EAhy926 (Lidington et al., 1999).

En conclusion, ICAM-1, au même titre que l'IL-6, l'IL-8 et le bFGF, représente une piste intéressante afin de caractériser les effets de l'HI combinée à un environnement inflammatoire sur le phénotype des cellules endothéliales.

▪ Etude de l'expression protéique de ICAM-1, IL-6, IL-8 et bFGF

1) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression protéique de ICAM-1

Suite aux résultats obtenus en PCR quantitative montrant une augmentation de l'expression de ICAM-1 en HI en présence de TNF- α par rapport à la N ou l'HC à 6h+0hR, ICAM-1 a fait l'objet davantage de recherches menées cette fois au niveau protéique. Pour étudier son expression protéique, un marquage en immunofluorescence a tout d'abord été réalisé et ceci directement après les 6h d'incubation en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α (6h+0hR) (Figure III.5). Les résultats montrent qu'en absence de TNF- α , l'expression protéique de ICAM-1 est très faible aussi bien en N qu'en HC et HI, ce qui correspond aux valeurs de Ct très élevées obtenues par la PCR quantitative suggérant un faible taux de transcrits (données non montrées). Par contre, comme on pouvait s'y attendre, le TNF- α induit une forte augmentation de l'expression protéique de ICAM-1 mais aucune différence d'expression n'est observée entre la N, l'HC et l'HI ; ce qui ne semble *a priori* pas correspondre avec le profil d'expression génique. Suite à cette observation, nous nous sommes demandés si l'expression protéique n'était pas saturée dans un premier temps. Nous avons alors émis l'hypothèse que si l'abondance des ARNm est plus élevée en HI qu'en N ou HC, l'expression protéique de ICAM-1 pourrait perdurer plus longtemps en HI qu'en N ou HC. Pour tester cette hypothèse, le marquage en immunofluorescence de ICAM-1 a été recommencé mais avec cette fois une période de réoxygénation suivant les 6h d'incubation de 4h (6h+4hR) ou de 16h (6h+16hR) (Figure III.6). En absence de TNF- α à 6h+4hR et à 6h+16hR, l'expression de ICAM-1 est toujours très faible voire indétectable. Par contre, comme à 6h+0hR, le TNF- α induit une forte augmentation de l'expression protéique de ICAM-1. A 6h+4hR, l'augmentation de

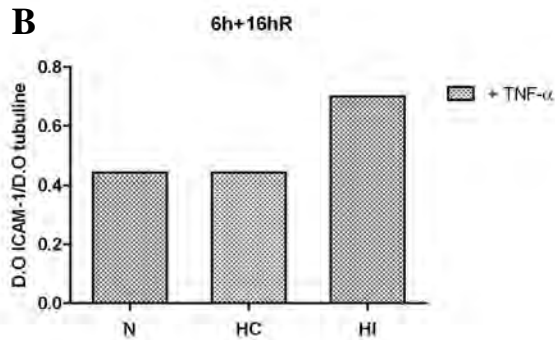
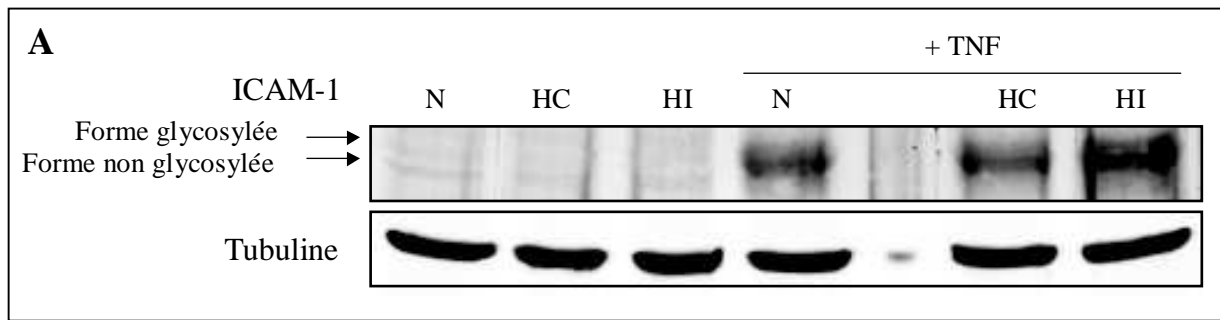


Figure III.7 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'abondance de la protéine ICAM-1 à 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml.

A. Après les 6h d'incubation suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), une extraction des protéines a été réalisée et la protéine ICAM-1 a été révélée par western blot. La protéine tubuline a été révélée sur la même membrane pour vérifier que la quantité de protéines chargées sur le gel est équivalente dans chaque puits.

B. La densité optique (D.O) des deux bandes groupées correspondant à ICAM-1 a été mesurée pour la N, l'HC et l'HI en présence de TNF- α et a été normalisée par la densité optique de la bande correspondant à la tubuline pour ces mêmes conditions (programme Odyssey LI-COR).

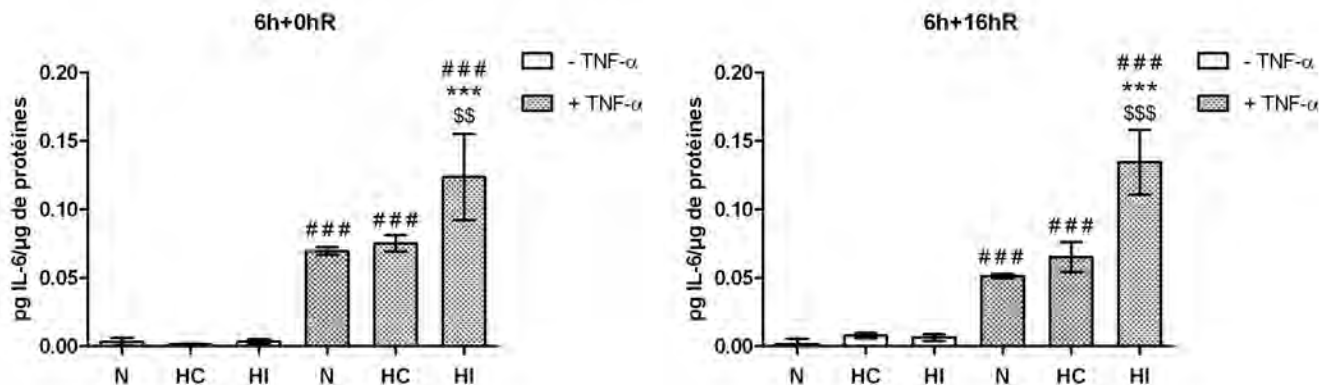


Figure III.8 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la sécrétion d'IL-6 à 6h+0hR et 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), les milieux d'incubation ont été récoltés et tous portés aux mêmes volumes. La sécrétion d'IL-6 par les cellules a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique pour trois expériences indépendantes (n=3). Les résultats de l'ELISA ont ensuite été normalisés par la quantité totale de protéines du puits correspondant et sont exprimés en picogrammes d'IL-6 par microgramme de protéines (moyenne \pm 1 écart-type). Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

l'expression de ICAM-1 induite par le TNF- α est plus faible en N et HC qu'en HI, ce qui est également observé à 6h+16hR. La comparaison de ces deux temps montre que l'expression de ICAM-1 continue à diminuer en N, qu'elle reste stable en HC et qu'elle est toujours très élevée en HI. Pour confirmer cette expression de ICAM-1 plus élevée en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+16hR de manière plus quantitative, une extraction protéique a été réalisée afin de détecter l'abondance de ICAM-1 par western blot (Figure III.7). Ce type d'extraction requiert l'utilisation d'un tampon de lyse spécial contenant un peu de SDS permettant de décrocher les protéines enchâssées en membrane. Il est intéressant de noter que deux bandes distinctes sont observées sur le western blot correspondant aux formes glycosylées (et donc plus lourdes) et non glycosylées de ICAM-1. La densité optique (D.O) des deux bandes groupées de ICAM-1 a été mesurée pour les conditions N, HC et HI en présence de TNF- α et a été normalisée sur la D.O de la bande correspondant à la tubuline. Les résultats obtenus confirment une abondance protéique de ICAM-1 très faible en absence de TNF- α en N, HC et HI ainsi qu'une abondance de ICAM-1 supérieure en HI par rapport à la N ou l'HC en présence de TNF- α .

En conclusion, trois méthodes différentes ont permis de mettre en évidence un effet synergique de l'HI et du TNF- α engendrant une expression génique et protéique augmentée de ICAM-1 et donc à plus grande échelle, l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales par ces facteurs environnementaux.

2) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-6

Comme nous avons observé une augmentation de l'expression en ARNm de l'IL-6 en HI sans TNF- α par rapport à l'HC à 6h+0hR et en HI avec ou sans TNF- α par rapport à la N et l'HC à 6h+4hR, la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales a été investiguée en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Les mesures de sécrétion ont été effectuées à deux temps différents, à 6h+0hR et à 6h+16hR. La sécrétion d'IL-6 a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique. Les résultats de l'ELISA ont ensuite été normalisés par la quantité totale de protéines de chaque puits afin de s'assurer que l'augmentation de la sécrétion ne provient pas d'une augmentation du nombre de cellules (Figure III.8). L'incubation des cellules en présence de TNF- α induit une forte augmentation de la sécrétion d'IL-6 à 6h+0hR et à 6h+16hR. Cette observation ne corrèle pas avec l'expression en ARNm qui n'est pas augmentée par le TNF- α mais bien par l'HI indépendamment du TNF- α . Ces résultats semblent donc suggérer une régulation post-transcriptionnelle de l'IL-6 par le TNF- α et non pas transcriptionnelle comme c'est le cas de l'IL-8 (expliqué ci-dessous). De plus, l'induction de la sécrétion par le TNF- α est plus élevée en HI par rapport à la N et l'HC aux deux temps, suggérant un effet combiné de ces deux facteurs sur la sécrétion de l'IL-6. Le profil de sécrétion observé aux deux temps est très similaire, avec approximativement les mêmes rapports de la quantité d'IL-6 sur la quantité totale de protéines. On peut également noter qu'à 6h+16hR, la quantité d'IL-6 sécrétée est quasiment doublée en HI en présence de TNF- α par rapport à la N et l'HC.

Ainsi, les cellules endothéliales exposées à l'HI et au TNF- α développent un phénotype pro-inflammatoire caractérisé par une sécrétion d'IL-6 plus élevée qu'en N et HC.

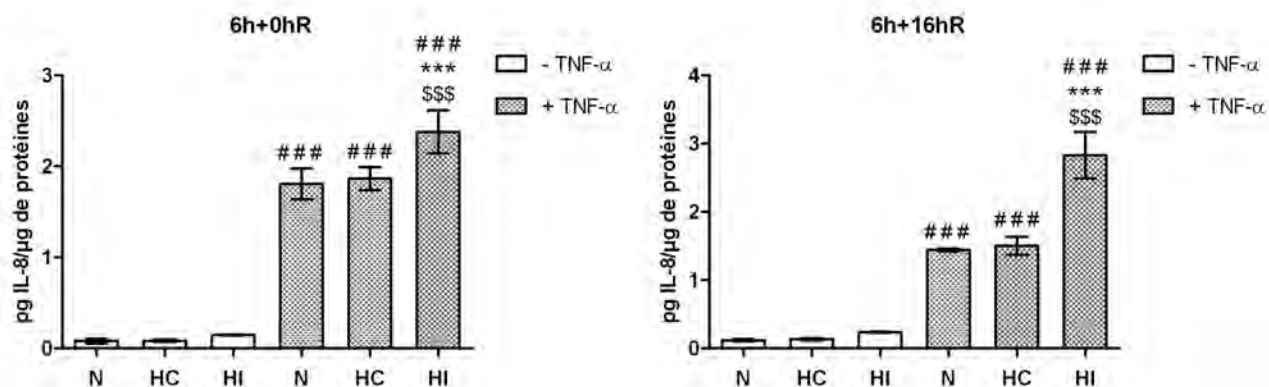


Figure III.9 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la sécrétion d'IL-8 à 6h+0hR et 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), les milieux d'incubation ont été récoltés et tous portés aux mêmes volumes. La sécrétion d'IL-8 par les cellules a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique pour trois expériences indépendantes (n=3). Les résultats de l'ELISA ont ensuite été normalisés par la quantité totale de protéines du puits correspondant et sont exprimés en picogrammes d'IL-8 par microgramme de protéines (moyenne \pm 1 écart-type). Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

3) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-8

Puisqu'une augmentation de l'expression en ARNm de l'IL-8 a été mise en évidence en HI en présence de TNF- α par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR, la sécrétion d'IL-8 par les cellules endothéliales a été étudiée en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Les mesures de sécrétion ont été effectuées à deux temps différents, 6h+0hR et 6h+16hR. Cette sécrétion d'IL-8 a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique. Les résultats de l'ELISA ont ensuite été normalisés par la quantité totale de protéines de chaque puits (Figure III.9). Directement après les 6h d'incubation (6h+0hR), une sécrétion basale d'IL-8 est observée en absence de TNF- α , qui est légèrement augmentée en HI seule par rapport à la N et l'HC. Par contre, la stimulation des cellules avec le TNF- α induit une forte augmentation de la sécrétion d'IL-8, corrélant avec l'augmentation du niveau d'ARNm induite par le TNF- α . L'induction de la sécrétion par le TNF- α est plus élevée en HI par rapport à la N et l'HC, suggérant une synergie des effets de l'HI et du TNF- α . Après les 6h d'incubation suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), l'augmentation de la sécrétion basale d'IL-8 en HI seule par rapport à la N et l'HC est à nouveau observée. De plus, l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 en présence de TNF- α en HI par rapport à la N et l'HC est également retrouvée avec une différence encore plus marquée qu'à 6h+0hR. Il est intéressant de noter que ces profils de sécrétion d'IL-8 montrent une très bonne corrélation avec celui de l'expression en ARNm.

En conclusion, l'HI en présence de TNF- α augmente la sécrétion d'IL-8 par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR et à 6h+16hR.

4) Effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion, l'abondance protéique et la localisation subcellulaire du bFGF

Les résultats précédemment obtenus ont montré que l'expression en ARNm du bFGF est augmentée à 6h+4hR en HI indépendamment de la présence ou l'absence de TNF- α par rapport à la N et l'HC. Au vu du rôle important de ce facteur de croissance dans l'angiogenèse via la stimulation des cellules endothéliales quiescentes, nous avons investigué l'influence de l'HI et du TNF- α sur son expression protéique.

4.1. Mesure de la sécrétion de bFGF

Plusieurs tentatives de mesure de la sécrétion du bFGF par les cellules endothéliales dans le milieu d'incubation à savoir le milieu CO₂ indépendant sans sérum ont été effectuées mais en vain. Aucune sécrétion n'était détectée avec un ELISA spécifique. D'autres études avaient déjà montré une impossibilité de mesurer le bFGF dans le milieu conditionné de plusieurs types cellulaires parce que ce facteur est stocké dans la MEC subendothéliale (Folkman et al., 1988; Vlodavsky et al., 1987). La lecture de plusieurs articles nous a alors donné des idées pour contourner ce problème. En effet, le bFGF, aussi appelé FGF2, est un membre de la famille des « heparin-binding growth factors ». Ce facteur se lie à l'héparine et à l'héparan sulfate de la MEC mais ne présente aucune affinité pour d'autres protéoglycans tels que le kératan sulfate ou la chondroïtine sulfate (Rapraeger et al., 1991). La liaison du bFGF à l'héparine ou à l'héparan sulfate permet d'une part la protection du bFGF de la dégradation et crée d'autre part un réservoir local de facteurs de croissance limitant fortement la diffusion et le relargage de ce facteur dans l'espace interstitiel. Ce réservoir local permet donc une régulation spatiale stricte de la signalisation induite par le bFGF ainsi qu'un stock élevé pouvant être mobilisé très rapidement. Le relargage du bFGF de la MEC est assuré par deux mécanismes : le clivage des composants de la MEC par diverses protéases ou la liaison d'une

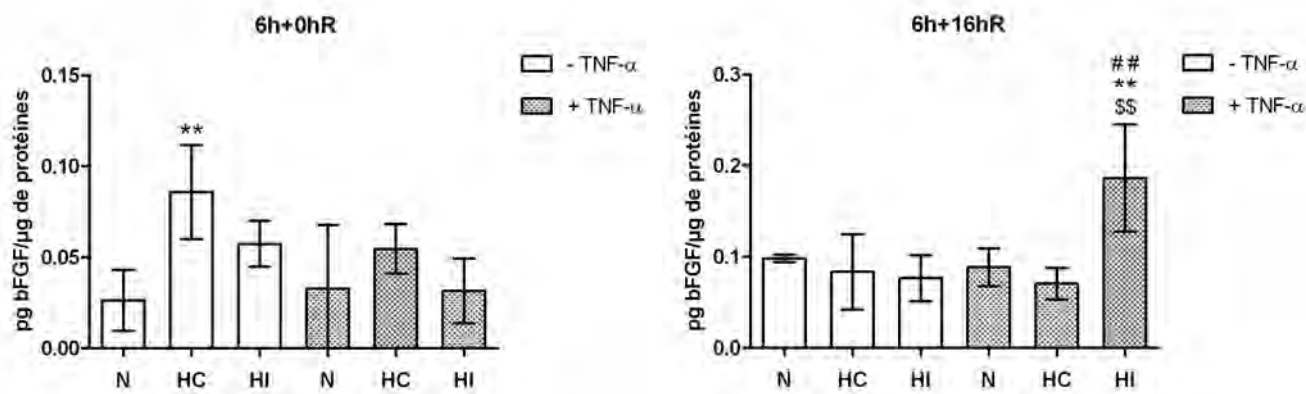


Figure III.10 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la sécrétion de bFGF à 6h+0hR et à 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), le milieu CO₂ indépendant a été remplacé par du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum et 25 mU/ml d'héparinase I. Après 3h d'incubation à 37°C, les milieux d'incubation ont été récoltés et une lyse cellulaire a été réalisée. La sécrétion de bFGF par les cellules a été mesurée à l'aide d'un ELISA spécifique pour trois expériences indépendantes (n=3). Les résultats de l'ELISA ont été normalisés par la quantité totale de protéines du puits correspondant et sont exprimés en picogrammes de bFGF par microgramme de protéines (moyenne \pm 1 écart-type). Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

protéine de transport, la FGF-BP (FGF-binding protein) (Powers et al., 2000). L'héparine est également requise pour la transduction efficace du signal puisqu'elle permet l'augmentation de l'affinité et du temps de demi-vie du complexe FGF/FGFR avant la liaison d'une deuxième molécule entraînant la dimérisation stable du récepteur (Ornitz, 2000). La liaison du bFGF à l'héparine et à l'héparan sulfate, démontrée *in vivo* et *in vitro*, pourrait alors expliquer son absence dans le milieu des cellules (Taverna et al., 2003). Une seconde information cruciale a été donnée par Taverna et al. montrant que les cellules vivantes ne relarguent le bFGF qu'en présence de sérum. Ainsi, en absence de sérum, les cellules en culture ne relarguent pas le bFGF dans leur milieu. Cependant, l'ajout de sérum induit le relarguage rapide de ce facteur par la libération de vésicules à partir de la membrane contenant le bFGF (Taverna et al., 2003).

Sur base de ces informations, un protocole d'étude de la sécrétion du bFGF par les cellules EAhy926 a été mis au point (Annexe 3). Nous avons remplacé après les 6h d'incubation en HI le milieu CO₂ indépendant par trois milieux différents contenant ou non de l'héparinase. Le milieu des cellules a été remplacé, dans un premier test, par du milieu CO₂ indépendant contenant ou non 25 mU/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 1h, 2h ou 3h à 37°C. La concentration en héparinase I, la température et le temps d'incubation ont été repris de l'article de Shute et al. (Shute et al., 2004). Dans un deuxième test, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum avec ou sans 25 mU/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 1h, 2h ou 3h à 37°C. Dans un troisième test, le milieu des cellules a été remplacé par un tampon particulier avec ou sans 0,5 µg/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 2h, 4h ou 6h à 24°C. La composition de ce tampon, la concentration de l'héparinase I, la température et le temps d'incubation ont été mis au point par Elkin et al. (Elkin et al., 2001). Les résultats ont montré qu'aucune sécrétion de bFGF n'est mesurée dans le milieu CO₂ indépendant même en présence d'héparinase I, ni dans le tampon de Vlodavsky, ce qui confirme que le bFGF n'est pas relargué en absence de sérum comme l'avaient montré Taverna et al. (Taverna et al., 2003). La condition choisie pour la suite des expériences est celle dans laquelle le milieu CO₂ indépendant a été remplacé après les 6h d'incubation par du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum et 25 mU/ml d'héparinase I et dans laquelle les cellules ont été incubées pendant 3h à 37°C. En effet, dans ces conditions, la présence de bFGF peut être détectée par ELISA.

Une fois ce protocole mis au point et afin de mesurer la sécrétion de ce facteur, les cellules ont d'abord été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF-α dans du milieu CO₂ indépendant sans sérum. Après les 6h d'incubation (6h+0hR), ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), le milieu d'incubation a été remplacé par du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum de veau fœtal ainsi que 25 mU/ml d'héparinase I. Les cellules ont alors été incubées pendant 3h à 37°C dans ce milieu. L'action combinée du sérum nécessaire à la sécrétion du bFGF et de l'héparinase permettant la libération de ce facteur de la MEC, a ainsi permis de mesurer pour la première fois une sécrétion de bFGF par les cellules EAhy926 (Figure III.10). Tout comme pour l'IL-6 et l'IL-8, les valeurs obtenues avec l'ELISA ont été normalisées sur base de la quantité totale en protéines du lysat cellulaire. Les résultats sont donc exprimés en picogrammes de bFGF par microgramme de protéines. A 6h+0hR, le TNF-α n'induit pas d'élévation de la sécrétion. Par contre, l'HC en absence de TNF-α induit un taux de sécrétion augmenté par rapport à la N. Néanmoins, une grande prudence doit être accordée à ce résultat étant donné la faible quantité de bFGF détectée, ce qui explique les écart-types relativement grands. A 6h+16hR, la sécrétion du bFGF est très fortement augmentée en HI en présence de TNF-α par rapport à toutes les autres conditions alors que ni le TNF-α ni l'HI seuls n'ont un effet.

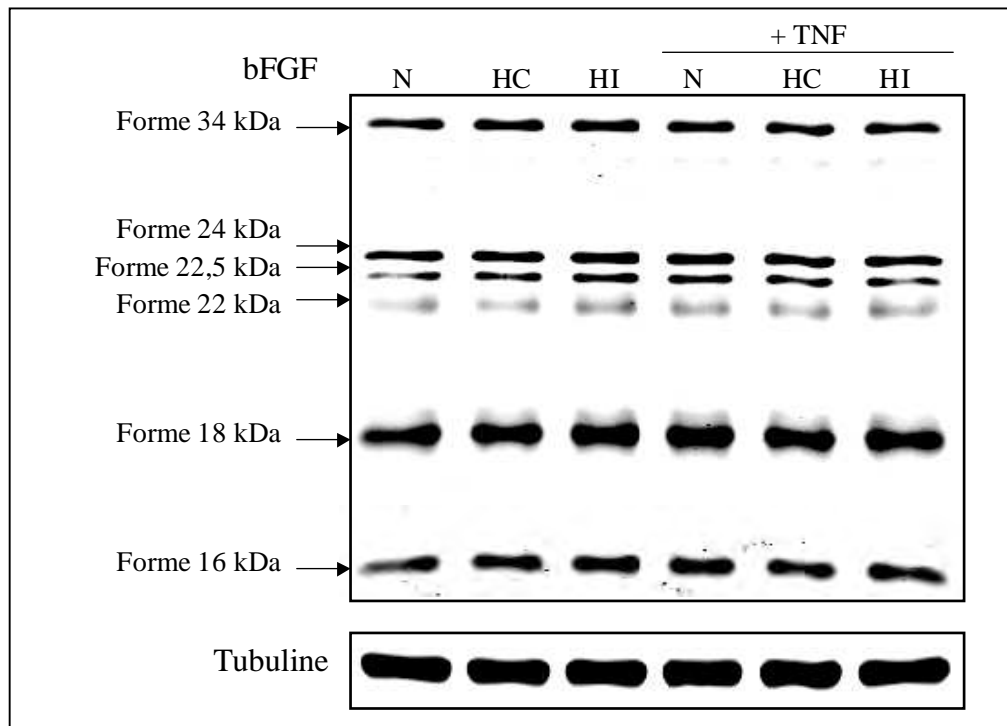


Figure III.11 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'abondance protéique de bFGF à 6h+16hR.

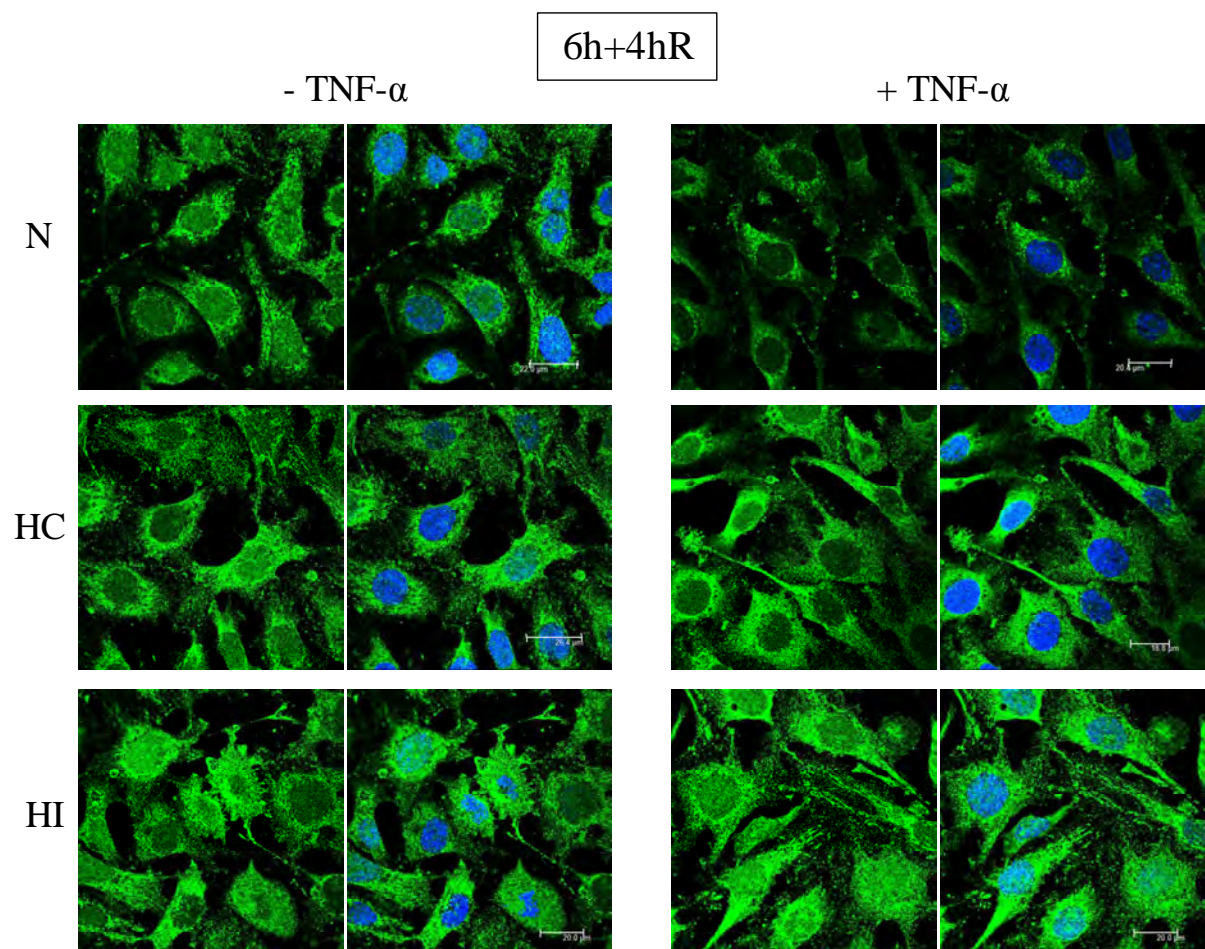
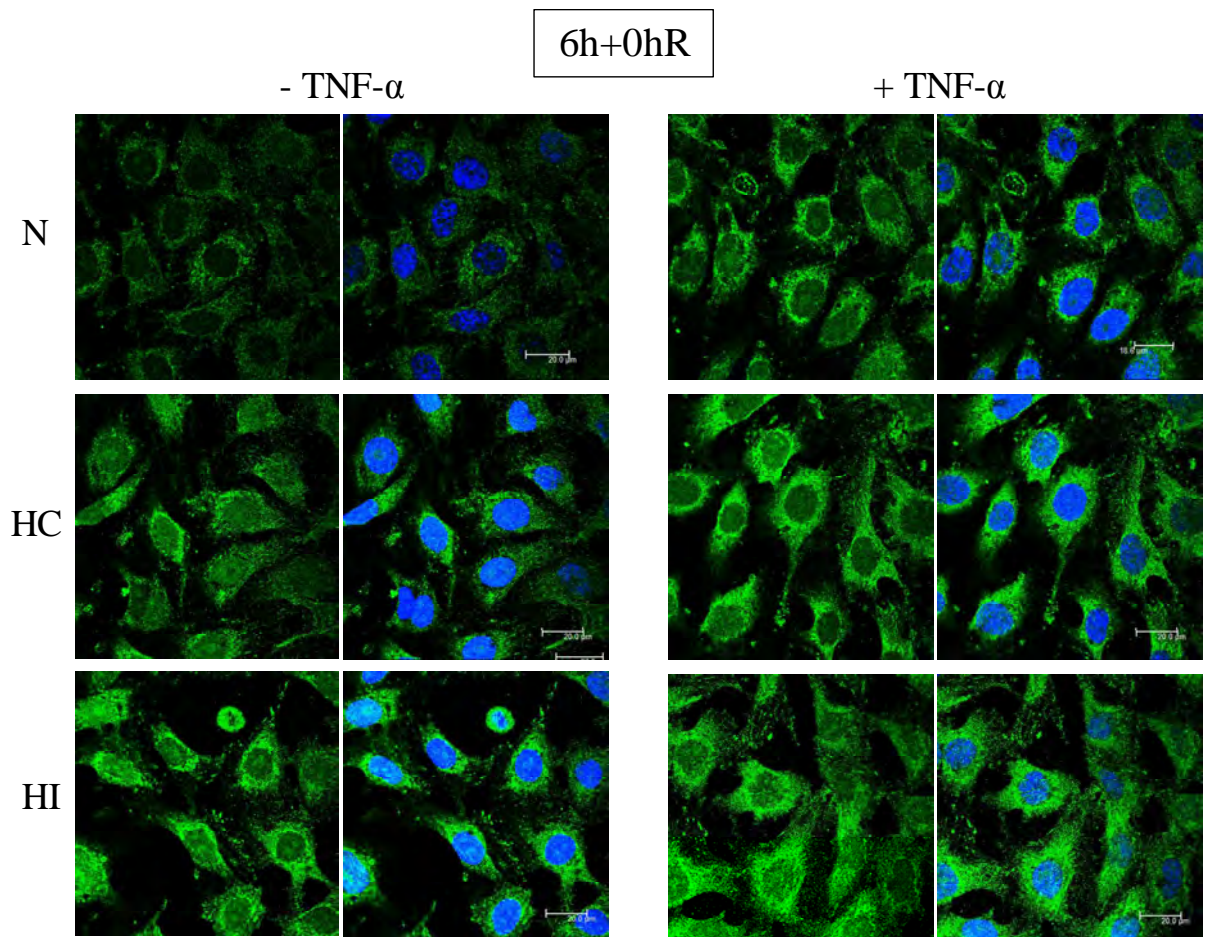
Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), une extraction des protéines a été réalisée et la protéine bFGF a été détectée par western blot. La protéine tubuline a été révélée sur la même membrane pour vérifier que la quantité de protéines chargées sur le gel est équivalente dans chaque puits.

En conclusion, l'HI en présence de TNF- α induit une augmentation de la sécrétion du bFGF par les cellules endothéliales à 6h+16hR.

4.2. *Mesure de l'abondance protéique du bFGF*

Suite à l'augmentation de la sécrétion de bFGF observée en HI en présence de TNF- α à 6h+16hR, nous avons décidé d'investiguer son abondance protéique. Si la protéine est sécrétée sans qu'il n'y ait de synthèse augmentée, on devrait observer une diminution de l'abondance protéique intracellulaire. Pour ce faire, un western blot a été réalisé avec les mêmes lysats que ceux utilisés pour mesurer l'abondance de ICAM-1 à 6h+16hR. Alors qu'on ne s'attendait à ne voir qu'une seule forme à 18 kDa, d'autres bandes sont apparues sur la membrane de transfert, fortement marquées elles aussi, suggérant leur spécificité. En fait, ces isoformes inattendues proviennent d'une initiation alternative de la traduction d'un même ARNm expliquée par la présence de différents sites de départ de la traduction. L'isoforme de faible poids moléculaire (lmw) à 18 kDa est essentiellement sécrétée par un mécanisme encore inconnu au contraire des isoformes de haut poids moléculaire (hmw), intracellulaires, détectées exclusivement dans le cytosol et le noyau (translocation nucléaire possible grâce à la présence de NLS) (Sorensen et al., 2006). Cinq isoformes ont été décrites chez l'homme : 18, 22, 22,5, 24 et 34 kDa (Okada-Ban et al., 2000; Sorensen et al., 2006). La forme 18 kDa est traduite à partir d'un codon de départ conventionnel AUG tandis que les formes hmw bFGF sont traduites à partir de sites d'initiation CUG en amont et en phase avec l'AUG. La traduction des formes à 22, 22,5 et 24 kDa est régulée par la présence d'un IRES tandis que la traduction de la forme à 34 kDa dépend de la coiffe et non d'un mécanisme d'initiation dépendant d'un IRES (Sorensen et al., 2006). Ces formes nucléaires stimulent l'activité de l'ARN polymérase I conduisant à une transcription augmentée des gènes ribosomiaux (Bouche et al., 1987). Les effets biologiques intracrines de ces formes intracellulaires sont très larges et dépendent du type cellulaire : la survie et la croissance en absence de sérum, l'induction d'un phénotype radiorésistant, etc. Ces isoformes hmw sont en fait spécifiquement exprimées dans les cellules transformées ou stressées. De plus, la forme 18 kDa, en se liant à son récepteur, est capable d'atteindre le cytosol et le noyau de sa cellule cible. En fait, la translocation nucléaire de cette forme exogène a été montrée comme étant nécessaire pour une réponse mitogénique complète et est médiée tout d'abord par l'endocytose du récepteur. Simultanément à cette endocytose du complexe bFGF/FGFR, la forme 18 kDa subit un clivage à son côté N-terminal donnant lieu à une forme de poids moléculaire encore plus faible de 16 kDa. Cette forme n'est alors retrouvée que dans le cytosol et le noyau (Sorensen et al., 2006) (Annexes 4 et 5).

En observant les résultats du western blot obtenus avec des extraits protéiques de cellules incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR) (Figure III.11), on retrouve toutes les formes citées ci-dessus : 16, 18, 22, 22,5, 24 et 34 kDa. La forme à 18 kDa venant de la traduction classique est plus abondante que les autres formes. Le TNF- α n'induit l'augmentation de l'abondance d'aucune des isoformes. Ce résultat corrèle avec ceux obtenus en PCR quantitative montrant que le TNF- α n'a aucun effet sur l'expression génique du bFGF. De plus, l'abondance protéique des isoformes ne semble pas varier dans les différentes conditions d'incubation. L'intensité plus faible des bandes N et HI+TNF- α semble être liée à un effet de bord plutôt qu'à un effet réellement spécifique.



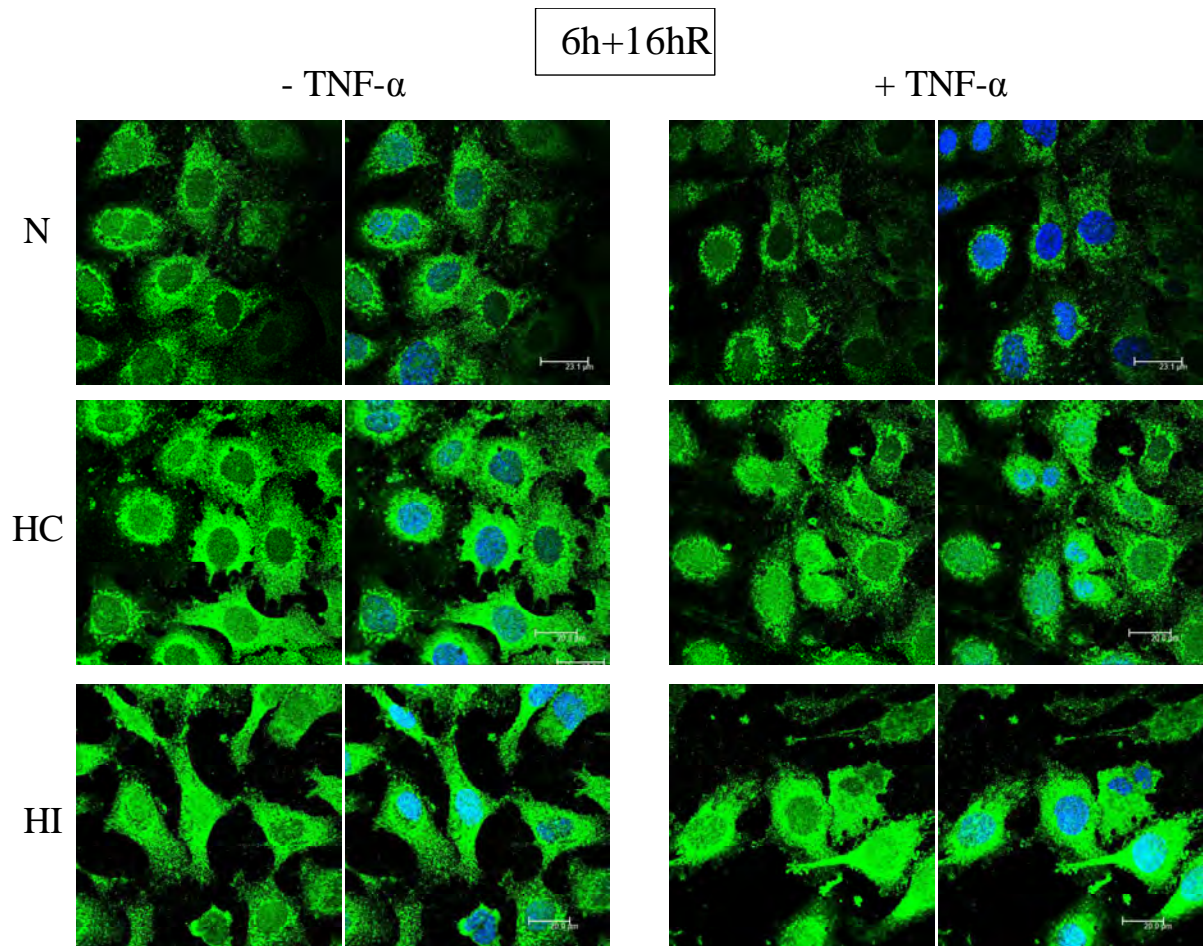


Figure III.12 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la localisation subcellulaire du bFGF à 6h+0hR, 6h+4hR et 6h+16hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) et après les 6h suivies de 4h (6h+4hR) ou de 16h (6h+16hR) de réoxygénation, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps primaire spécifique au bFGF et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa 488. Le noyau a également été marqué par l'agent intercalant TOPRO-3. Le marquage en immunofluorescence est ensuite observé à l'aide d'un microscope confocal utilisant un photomultiplicateur constant. Le marquage bleu représente les noyaux tandis que le marquage vert représente le bFGF.

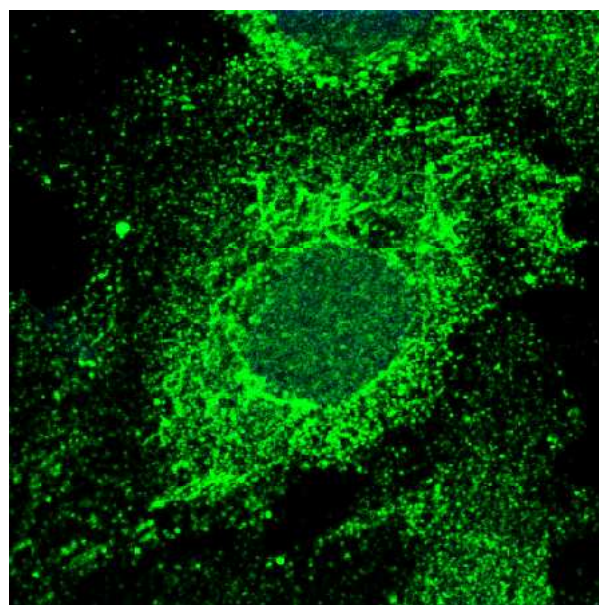


Figure III.13 : Organisation du bFGF en un réseau.

Agrandissement au niveau d'une cellule incubée en HC sans TNF- α à 6h+4hR.

4.3. Localisation subcellulaire du bFGF

a) Localisation nucléaire

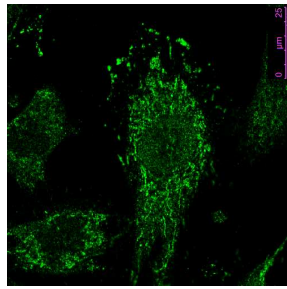
Puisque le western blot ne met en évidence aucune variation d'abondance protéique des isoformes du bFGF en fonction des conditions d'incubation, nous avons décidé d'étudier une éventuelle translocation nucléaire du bFGF. En effet, la localisation nucléaire pourrait augmenter indépendamment de variations dans l'abondance protéique totale. Pour cela, un marquage en immunofluorescence a été réalisé en utilisant le même anticorps que celui utilisé lors du western blot, assurant ainsi que toutes les formes soient bien marquées. Les cellules ont d'abord été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α dans du milieu sans sérum. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou les 6h suivies de 4h (6h+4hR) ou de 16h (6h+16hR) de réoxygénation, les cellules ont été fixées, perméabilisées et le bFGF ainsi que les noyaux ont été marqués (Figure III.12). A 6h+0hR en absence de TNF- α , l'intensité du marquage en HI et en HC semble plus élevée qu'en N. Le TNF- α semble également augmenter l'expression du bFGF. De plus, la présence de bFGF dans le noyau est observée en HI en présence et en absence de TNF- α . A côté de ces informations, nous avons surtout été surpris de l'organisation du marquage du bFGF faisant penser à un réseau ; cette organisation est très clairement visualisée dans toutes les conditions à 6h+0hR (Figure III.13, agrandissement au niveau d'une cellule). A 6h+4hR, aucune variation d'abondance du bFGF n'est observée mais la localisation nucléaire plus élevée en HI avec ou sans TNF- α est toujours observée ainsi qu'une organisation du marquage associé au bFGF en réseau. A 6h+16hR, le « beau » réseau mis en évidence à 6h+0hR se perd en N tandis qu'il reste bien défini en HI. En effet, en N, le signal observé semble fortement périnucléaire et forme un « anneau » autour du noyau, ce qui est également un peu observé en HC. Les cellules incubées en HI montrent, au contraire, un signal bien étendu dans toute la cellule avec un aspect de réseau encore bien marqué. De plus, la différence de la localisation nucléaire est encore plus frappante à ce temps-ci, avec pratiquement tous les noyaux « turquoise » en HI signifiant une forte localisation nucléaire du bFGF et une certaine partie des noyaux en HC alors qu'ils restent bien « bleus » en N signifiant une absence de bFGF dans le noyau. Il faut également noter que la localisation subcellulaire du bFGF n'est pas que nucléaire et reste majoritairement cytoplasmique. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation du bFGF dans d'autres organites. Yu et al. ont d'ailleurs montré la présence de bFGF dans des vésicules cytoplasmiques liées à la membrane plasmique suggérant un processus d'exocytose (Yu et al., 1993).

En conclusion, l'HI augmente l'abondance protéique du bFGF en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR. L'HI augmente aussi la localisation nucléaire du bFGF, et ce de façon de plus en plus marquée au cours du temps de réoxygénation. De plus, le bFGF démontre une organisation de localisation cytoplasmique en réseau dans toutes les conditions à 6h+0hR et à 6h+4hR mais ce réseau s'arrondit en N et légèrement en HC à 6h+16hR.

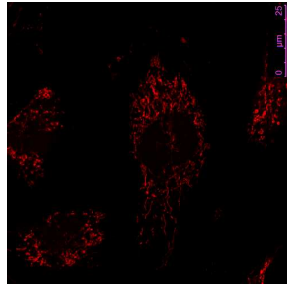
b) Localisation mitochondriale

L'organisation en réseau du bFGF nous a alors fait penser à celle du réseau mitochondrial. En effet, la perturbation du réseau mitochondrial en HC montrant une organisation périnucléaire avait déjà été observée sur d'autres types cellulaires au sein du laboratoire (mémoire d'Annick Notte), avec un arrondissement plus ou moins similaire à ce qu'on peut observer pour le marquage des structures contenant le bFGF. Un double marquage des mitochondries et du bFGF a donc été réalisé afin de vérifier une éventuelle co-localisation des marquages (Figure III.14). Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF-

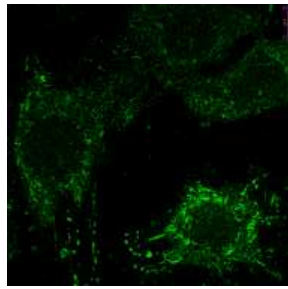
N 6h+0hR



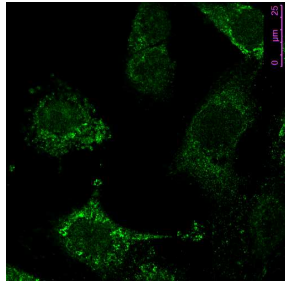
- TNF- α



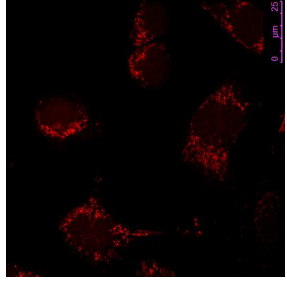
+ TNF- α



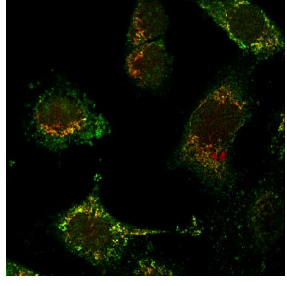
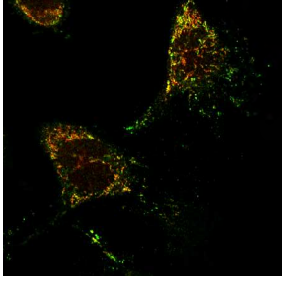
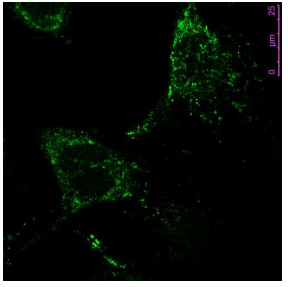
HC 6h+0hR



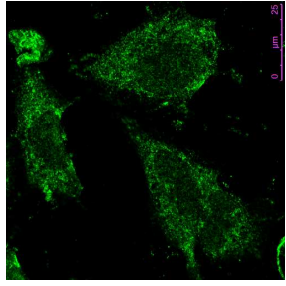
- TNF- α



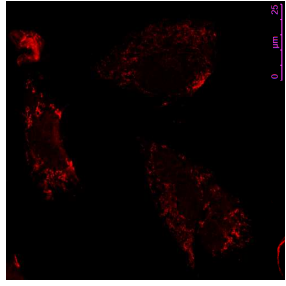
+ TNF- α



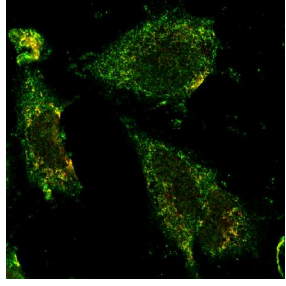
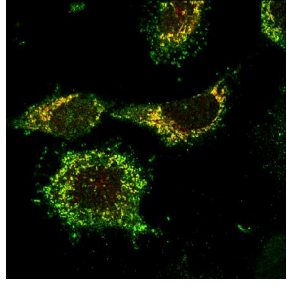
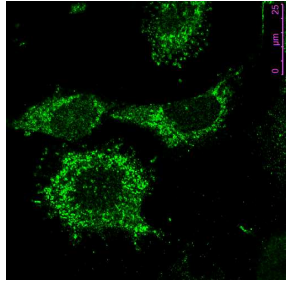
HI 6h+0hR



- TNF- α



+ TNF- α



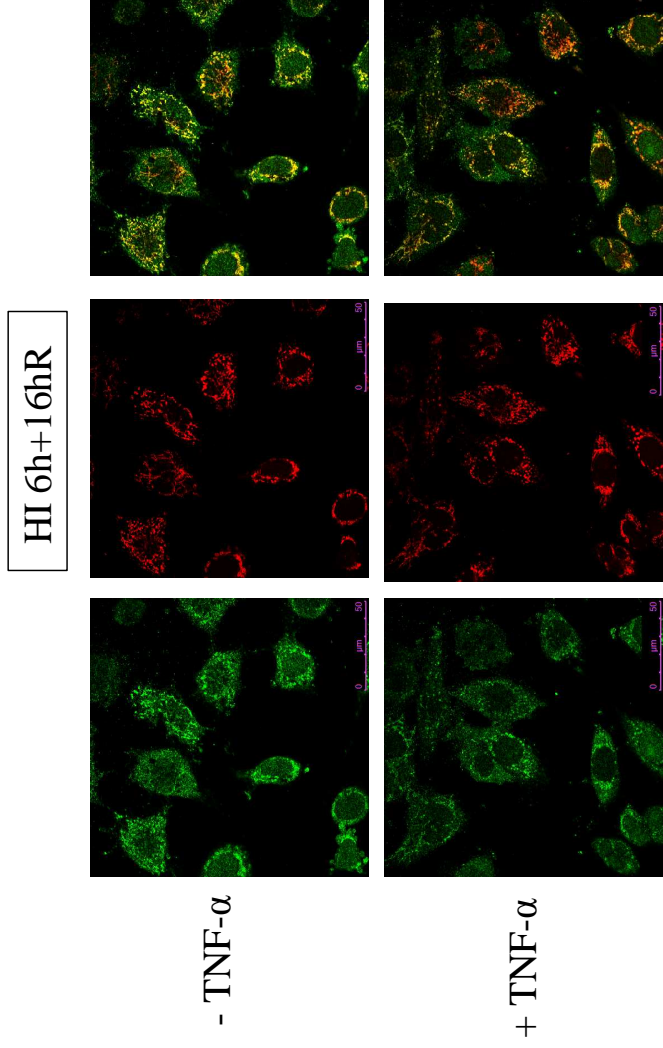
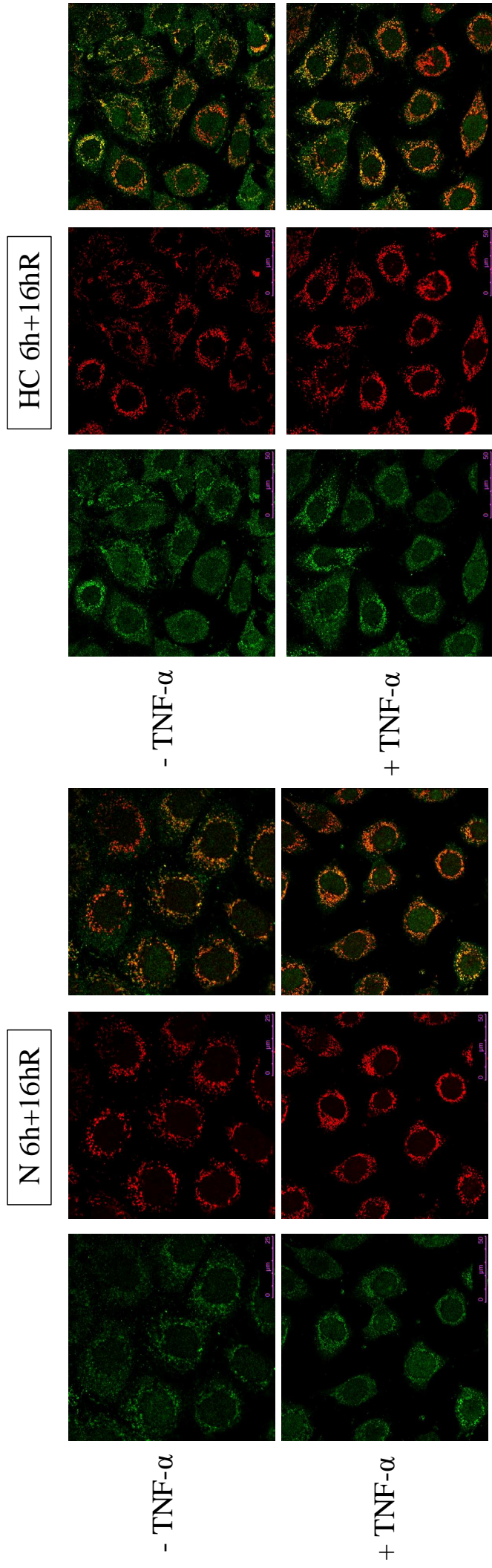


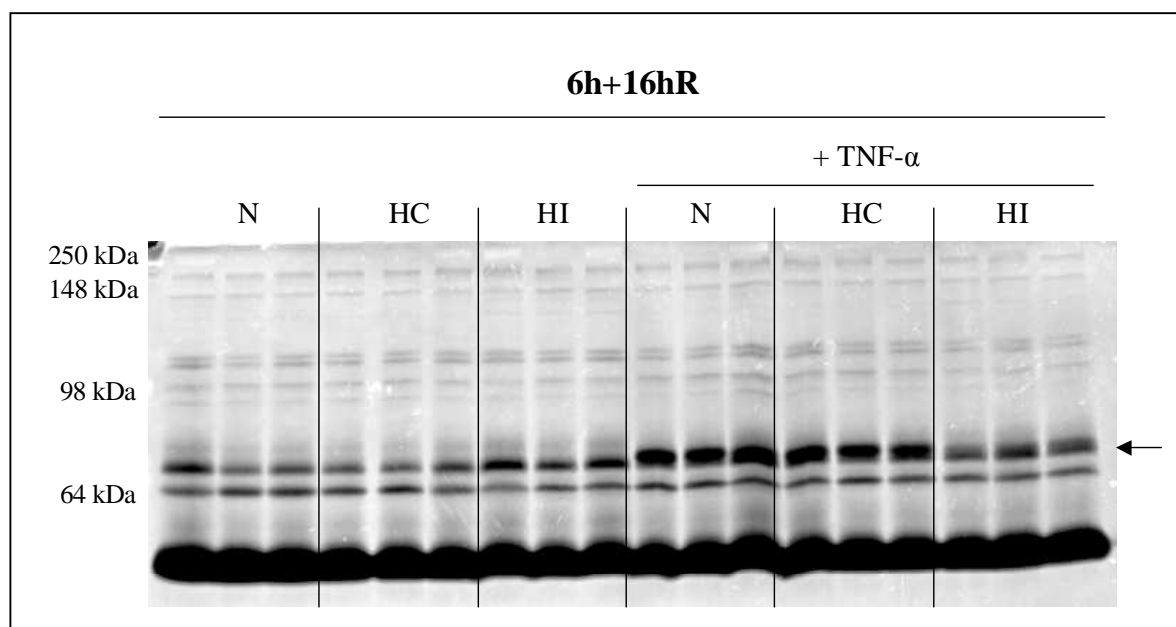
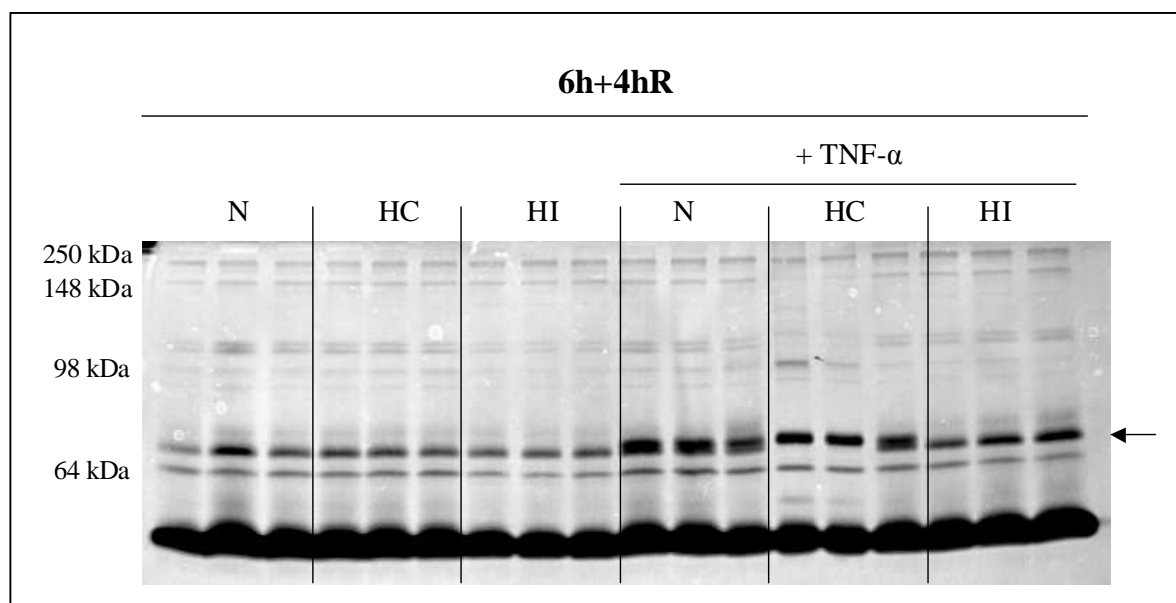
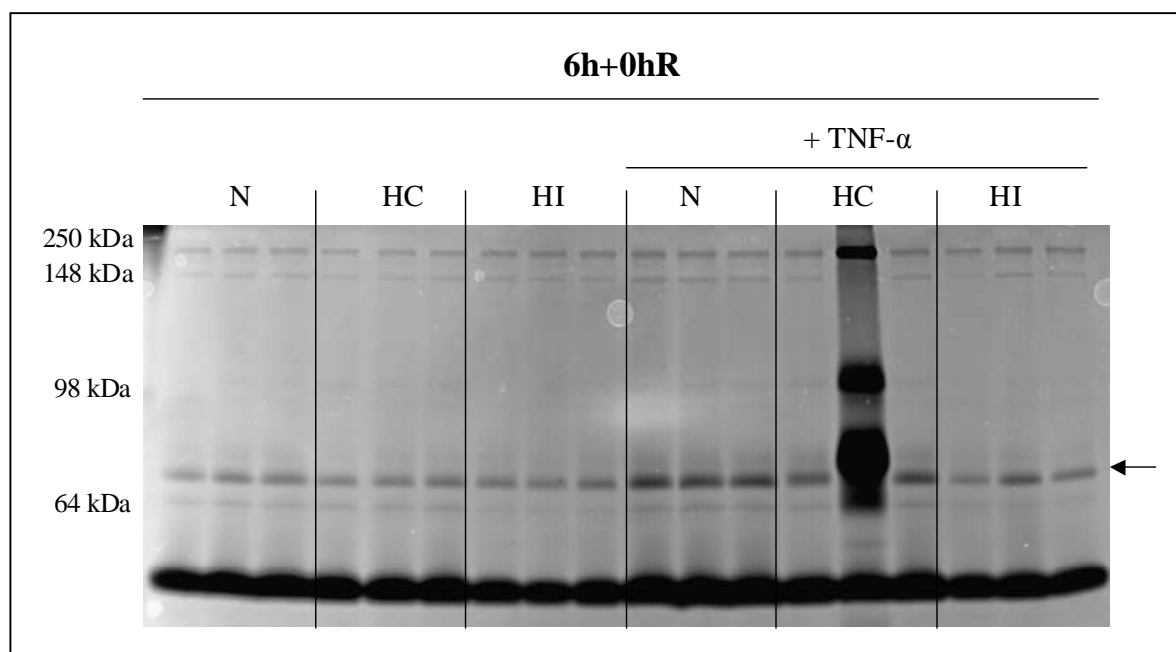
Figure III.14 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la co-localisation du bFGF avec les mitochondries à 6h+0hR et 6h+16hR.

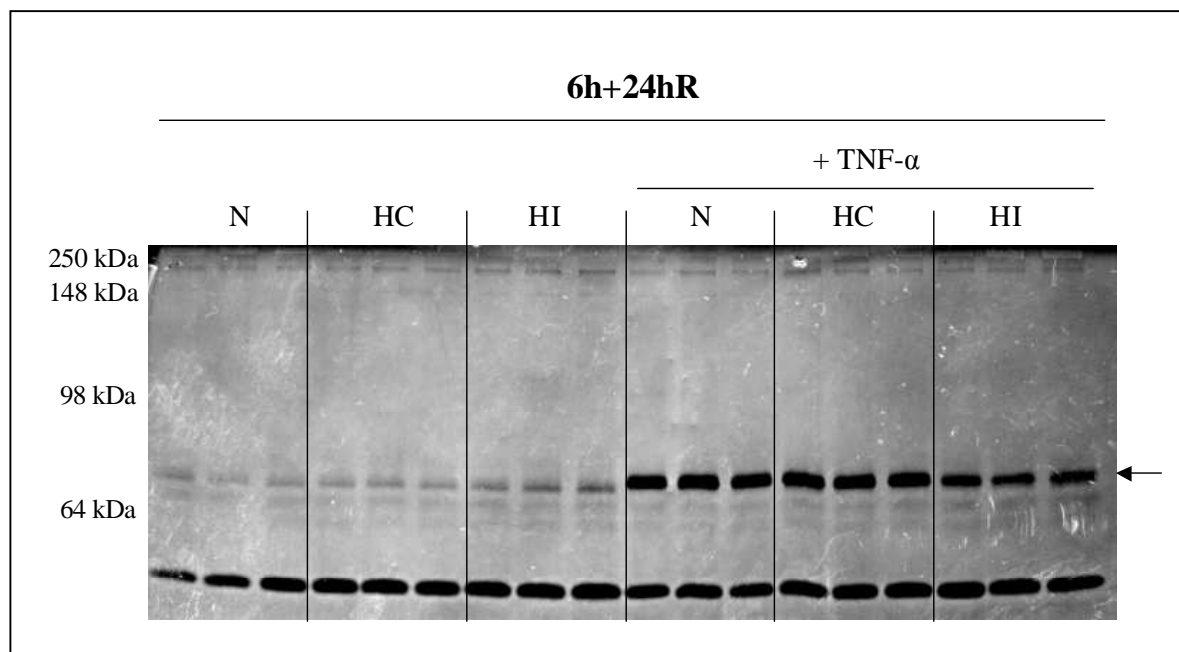
Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), le milieu CO₂ indépendant a été remplacé par du milieu CO₂ indépendant contenant 250 nM de sonde mitochondre Red CMXRos. Les cellules ont alors été incubées pendant 20 min à 37°C en présence de cette sonde. Les cellules ont ensuite été lavées 2x au PBS, puis fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps primaire spécifique au bFGF et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa 488. Le marquage en immunofluorescence a ensuite été observé à l'aide d'un microscope confocal utilisant un photomultiplicateur constant. Le marquage rouge représente les mitochondries tandis que le marquage vert représente le bFGF.

α . Deux temps ont été utilisés pour ce double marquage : le temps directement après les 6h d'incubation (6h+0hR) où l'organisation du marquage du bFGF en réseau est observée dans toutes les conditions et le temps après les 6h d'incubation suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR) où l'organisation du marquage du bFGF semble perturbée en N et HC avec ou sans TNF- α . A 6h+0hR, l'organisation du bFGF en réseau a bien été retrouvée dans toutes les conditions avec, à noter, toujours une augmentation de l'abondance du bFGF en HI par rapport à la N et l'HC. Le marquage des mitochondries avec la sonde mitotracker Red permet de bien visualiser le réseau mitochondrial. La superposition des deux marquages (bFGF en vert et mitochondries en rouge) montre une très belle co-localisation (jaune) dans toutes les conditions, avec un marquage un peu plus jaune en HI dû à l'augmentation de l'abondance du bFGF et donc du signal vert. A 6h+16hR, comme observé avec le marquage du bFGF seul, l'organisation du bFGF en réseau est perturbée en N et en HC avec une concentration périnucléaire du signal tandis qu'elle ne l'est pas en HI. Le réseau mitochondrial quant à lui s'arrondit fortement en N et HC mais est encore bien étendu en HI. Ces observations suggèrent que l'HC et la déprivation en sérum en N désorganisent le réseau mitochondrial alors que l'HI semble prévenir cette désorganisation. La superposition des deux marquages montre à nouveau une très nette co-localisation entre le bFGF et les mitochondries avec un signal plus orangé que jaune en N et HC par rapport à l'HI dû à une augmentation de l'abondance du bFGF dans cette condition (signal plus vert et donc superposition plus jaune).

De manière générale, il faut noter que quasiment toutes les mitochondries co-localisent avec le bFGF tandis que tout le bFGF ne se retrouve pas que dans les mitochondries, suggérant que la localisation dans ces organites ne concerne qu'une ou quelques isoforme(s) du bFGF. Une co-localisation du bFGF avec le noyau et les mitochondries a donc été observée mais d'autres doubles marquages pourraient être envisagés pour identifier les autres compartiments subcellulaires dans lesquels le bFGF se localise. Pour répondre à cette question, un autre double marquage a été réalisé pour le bFGF et les lysosomes. Le marquage des lysosomes avec la sonde lysotracker n'a pas été efficace et seulement quelques cellules présentaient le marquage. Cependant, sur toutes les cellules montrant le marquage des lysosomes, aucune co-localisation entre le bFGF et les lysosomes n'a été observée dans aucune des conditions à savoir la N, l'HC, l'HI en présence ou non de TNF- α à 6h+0hR et 6h+16hR (Annexe 6). Ce résultat doit être pris avec précaution et l'expérience devra être recommencée en ajustant le protocole afin de s'assurer de la bonne spécificité du marquage des lysosomes avec la sonde. Néanmoins, Yu et al. ont déjà montré une absence d'immunoréactivité vis-à-vis du bFGF dans les lysosomes, le RE et le Golgi (Yu et al., 1993), ce qui confirme ce résultat préliminaire.

En conclusion, la sécrétion du bFGF augmente en HI en présence de TNF- α par rapport à la N et l'HC à 6h+16hR. Cependant, aucune variation d'abondance protéique des différentes isoformes entre les conditions n'a été détectée en western blot. L'étude de la localisation subcellulaire a alors montré que le bFGF se retrouve dans différents compartiments dont le noyau et les mitochondries. La localisation nucléaire du bFGF est augmentée en HI indépendamment du TNF- α de façon de plus en plus marquée au cours du temps de réoxygénation. La localisation mitochondriale est quant à elle observée dans chaque condition et un effet protecteur de l'HI vis-à-vis du réseau mitochondrial a pu être souligné à 6h+16hR.

A



B

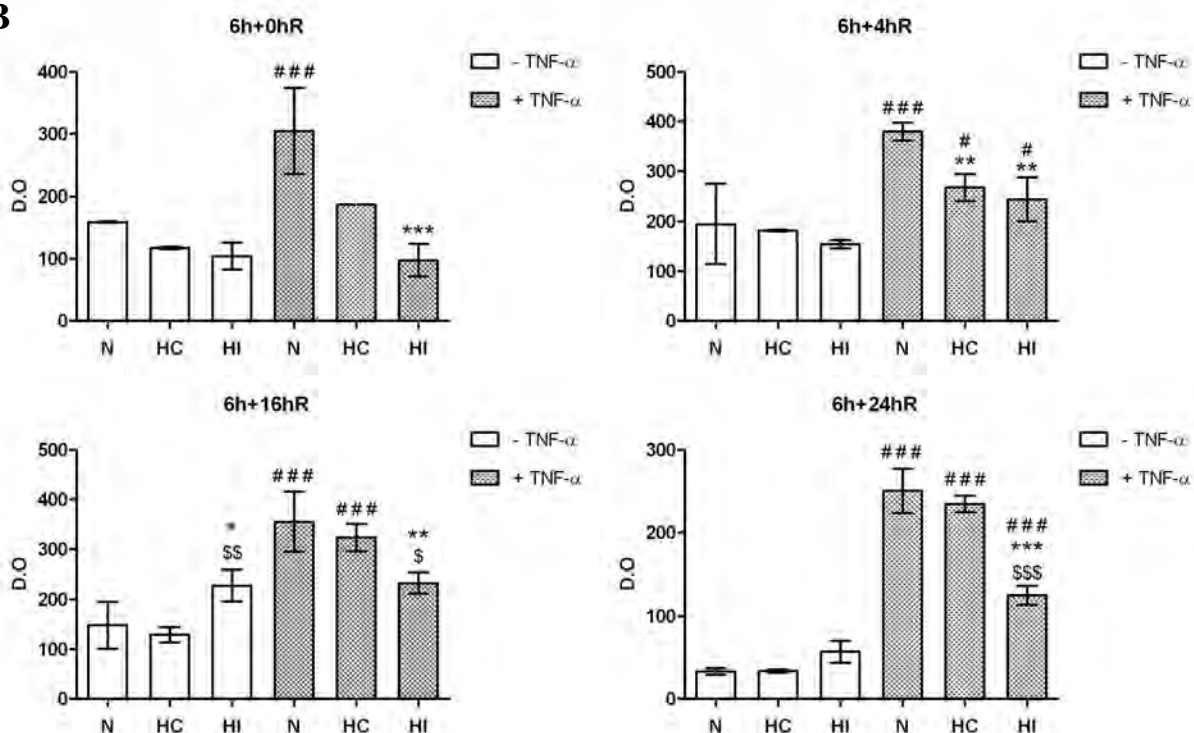


Figure III.15 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'activité de protéases présentes dans le milieu d'incubation à 6h+0hR, 6h+4hR, 6h+16hR et 6h+24hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1ng/ml. Après les 6h (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h (6h+4hR), 16h (6h+16hR) ou 24h (6h+24hR) de réoxygénation, la totalité de chaque milieu d'incubation (1 ml) a été récoltée. Le milieu est ensuite concentré jusqu'à 30 μ l. La quantité de surnageant déposée sur les zymogrammes (grands gels) a été normalisée par la quantité totale de protéines du puits correspondant. **A.** L'activité des protéases dans les milieux est observée par zymographie, où les bandes noires représentent les endroits où la gélatine a été digérée. Trois milieux différents ont été chargés pour chaque condition. **B.** La densité optique (D.O) de la bande d'intérêt (pointée à l'aide d'une flèche) a été mesurée à l'aide du programme ImageQuantL. Toutes les D.O d'un même gel peuvent être comparées. Ainsi, la moyenne et l'écart-type des D.O pour chaque condition ont été calculés et représentés sur un graphique (n=3, moyenne \pm 1 écart-type). Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

Remarque : La D.O de seulement 2 échantillons a été mesurée pour l'HC+TNF- α à 6h+0hR car un des échantillons semble être contaminé (n=2).

2^{ème} partie : Etude des variations d'activité de protéases impliquées dans le remodelage matriciel

1) Profil d'activité de protéases digérant la gélatine présentes dans le milieu des cellules endothéliales

Li et al. ont montré que le traitement de cellules endothéliales avec de l'IL-8 recombinante augmente la migration des cellules endothéliales (HUVEC et HMEC) et leur capacité à former des structures tubulaires. Ils expliquent ces effets par l'augmentation des niveaux d'ARNm de MMP-2 et MMP-9 ainsi que par l'augmentation de leur activité enzymatique (Hu et al., 1993). Dans ce travail, aucune modification de l'expression génique de MMP-2 à 6h+0hR ou à 6h+4hR n'a été observée. De plus, l'abondance des ARNm de MMP-9 augmentée par le TNF- α est fortement réduite par l'HI. Ainsi, aucune corrélation entre la sécrétion d'IL-8 que nous avons montrée être augmentée par l'HI en présence de TNF- α à 6h+0hR et les niveaux d'expression génique de MMP-2 et MMP-9 n'est observée. Afin de déterminer si l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 ou d'autres effets de l'HI et du TNF- α ne pourrait pas se répercuter directement sur l'activité enzymatique de ces protéases matricielles (de type gélatinase), nous avons quantifié cette activité par la technique de zymographie. Pour ce faire, les milieux de cellules endothéliales incubées en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α ont été récoltés à différents temps et ont été chargés sur plusieurs gels contenant comme substrat de la gélatine (Figure III.15). Ainsi, les milieux ont été récoltés directement après les 6h d'incubation (6h+0hR), ou après les 6h suivies de 4h (6h+4hR), 16h (6h+16hR) ou 24h (6h+24hR) de réoxygénation. Ces longs temps de réoxygénation ont été utilisés suite à la publication de Ben-Yosef et al. qui avaient montré, par zymographie, que l'activité de MMP-2 était réduite après 6h d'HC par rapport à la N alors qu'elle était augmentée après 6h suivies de 24h de réoxygénation (Ben-Yosef et al., 2002). Trois échantillons d'expériences indépendantes ont été récoltés pour chaque condition et ont été chargés sur un même gel pour comparer les triplicats. Avant d'être chargés, les milieux ont été concentrés jusqu'à un volume final de 30 μ l et la quantité de milieu déposée sur le gel a été normalisée sur base de la quantité totale de protéines du puits correspondant.

A 6h+0hR, cinq bandes bien individualisées sont observées sur le zymogramme. La densité optique (D.O) de chaque bande a été mesurée à l'aide du programme ImageQuantL. Une des cinq bandes (montrée par une flèche) montre une D.O augmentée en présence de TNF- α . Le TNF- α a donc un effet positif sur l'activité d'une enzyme migrant à un poids moléculaire approximatif de 70 kDa. L'HI diminue l'augmentation de l'activité induite par le TNF- α . Par contre, aucune augmentation d'intensité de ces cinq bandes n'a été observée en HI seule ou en HI avec TNF- α . Cette même constatation a été faite pour le temps 6h+4hR. Par contre à 6h+16hR, l'intensité de la bande pointée par une flèche est augmentée en HI seule comparée à la N et l'HC. La mesure de la D.O a confirmé cette observation de manière quantitative. A 6h+24hR, l'augmentation de la bande est également retrouvée en HI seule par rapport à la N et l'HC. La mesure de la D.O confirme également cette observation même si cette augmentation n'apparaît plus comme significative lors de l'analyse des données par une ANOVA 2. La D.O de cette bande d'intérêt a aussi été mesurée aux temps 6h+0hR et 6h+4hR, ne montrant aucune différence significative entre la N, l'HC et l'HI en absence de TNF- α . Il semblerait donc que l'activité de cette protéase, capable de digérer la gélatine et migrant à un poids moléculaire apparent de 70 kDa, soit augmentée en HI en absence de TNF- α à 6h+16hR par rapport à la N et l'HC et soit augmentée à tous les temps par le TNF- α mais dont l'HI diminue à chaque fois l'effet.

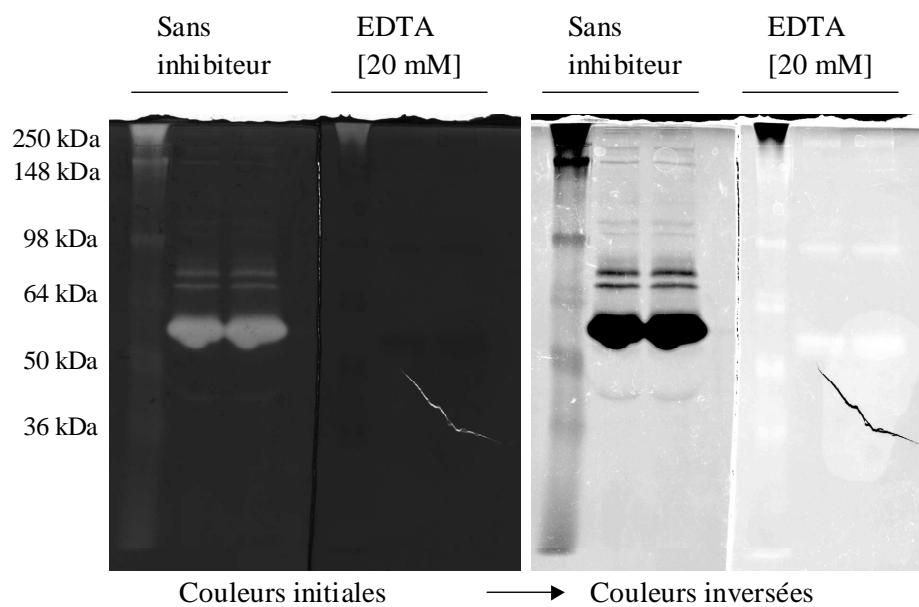


Figure III.16 : Identification des protéases observées sur les zymogrammes – Utilisation d’EDTA. De l’EDTA à une concentration de 20 mM a été ajouté dans le tampon d’activation. Etant donné sa propriété de puissant chélateur de cations, sa présence dans le tampon d’activation inactive les MMPs nécessitant du Ca^{2+} pour leur activité enzymatique.

En conclusion, l'activité d'une protéase capable de digérer la gélatine est augmentée significativement en HI en absence de TNF- α à 6h+16hR par rapport à la N et l'HC. Les protéases, étant essentielles à l'angiogenèse et à l'invasion des cellules tumorales ainsi qu'à la libération de molécules bioactives emprisonnées dans la MEC, sont des acteurs majeurs de la progression tumorale. Cette protéase pourrait donc constituer une cible pour la conception de nouvelles thérapies. Dès lors, nous avons voulu l'identifier.

2) Identification des protéases dont l'activité a été détectée par zymographie

Au vu de ces résultats intéressants, nous avons voulu identifier les protéases présentes dans les cinq bandes observées sur les zymogrammes. L'identification n'est pas chose facile malgré l'utilisation d'un étalon de poids moléculaire. En effet, la migration dans un gel contenant de la gélatine est modifiée par rapport à celle observée sur un gel SDS-PAGE. Cette légère différence de migration peut venir de l'utilisation de conditions non dénaturantes pour la zymographie au contraire d'un gel SDS-PAGE classique utilisé pour le western blot. Or, les standards de poids moléculaire sur le marché contiennent tous un agent réducteur ; leur migration est donc un peu modifiée sur un zymogramme (Hawkes et al., 2001). De plus, la nature des protéases présentes dans le milieu varie d'un type cellulaire à l'autre. Ces protéases peuvent également s'associer à d'autres protéines sécrétées par les cellules et ainsi différentes combinaisons sont possibles, variant entre les types cellulaires. L'utilisation d'un étalon spécifique pour l'identification des protéases est donc impossible. De surcroît, une même protéase existe sous différentes formes, latente ou précurseur, intermédiaire et active (Sounni et al., 2003). Il est généralement accepté que les bandes de dégradation peuvent venir soit de la forme active, soit de la forme précurseur latente. L'activité de la forme précurseur peut être expliquée par la présence de SDS qui cause la dénaturation de l'enzyme. L'étape d'activation conduit ensuite à la renaturation de l'enzyme, pouvant alors induire un balancement d'une cystéine libérant le Zn^{2+} et rendant l'enzyme semi-active sous une forme précurseur de plus haut poids moléculaire (~8-10 kDa en plus que la forme pleinement active dont le pro-domaine a été clivé) (Annexe 7). Ainsi, l'avantage de cette technique est qu'elle permet la détection des formes pro-enzymes (zymogènes) latentes et des formes actives. De plus, c'est une méthode très sensible qui permet la détection jusqu'à des niveaux de 10 picogrammes. Il est également important de noter que le SDS dissocie les MMPs de leurs inhibiteurs, les TIMPs. Néanmoins, des complexes d'interactions fortes de MMPs avec d'autres petites protéines non dissociés pendant la zymographie peuvent tout de même exister (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005).

Dès lors, afin d'identifier les protéases capables de dégrader la gélatine et observées sur les zymogrammes, plusieurs inhibiteurs différents ont été utilisés. Les principales enzymes capables de dégrader la gélatine sont la MMP-2 et la MMP-9, étant toutes deux des métalloprotéinases de type gélatinase. Néanmoins, il faut préciser que la gélatine utilisée comme substrat pour les enzymes n'est pas totalement pure et constitue plutôt un mélange hétérogène de peptides solubles issus du collagène. Il ne faut donc pas s'étonner si d'autres enzymes que les gélatinases sont capables de dégrader le substrat de ces gels.

Pour faciliter l'observation des résultats, les couleurs des zymogrammes ont été inversées (Figure III.16). En effet, un zymogramme est caractérisé par des bandes blanches qui ressortent sur un fond bleu montrant les endroits où le bleu de Coomassie n'a pas pu colorer la gélatine, c'est-à-dire, là où elle a été digérée. Afin de vérifier si les enzymes présentes dans

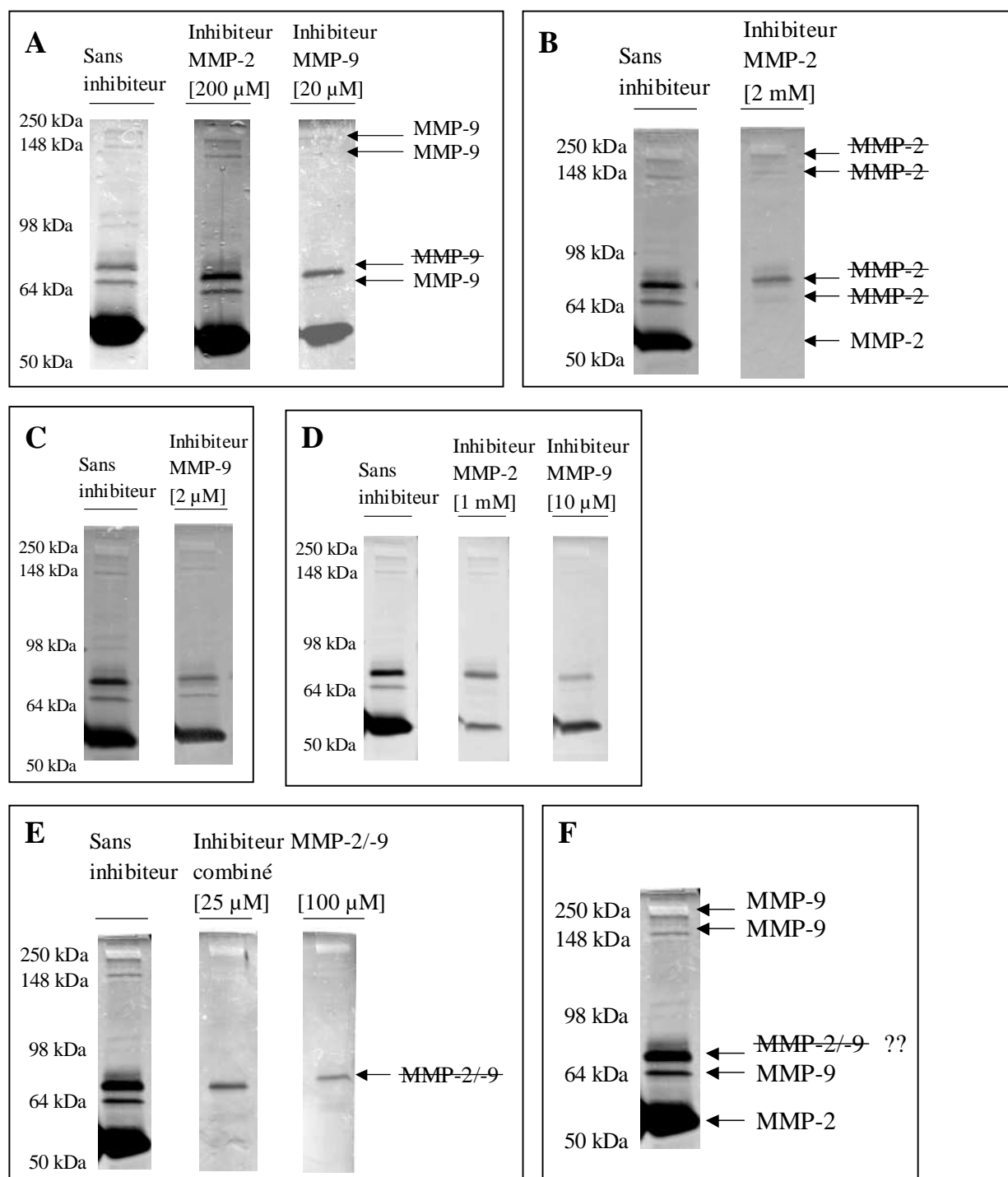


Figure III.17 : Identification des protéases observées sur les zymogrammes - Utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MMP-2, de MMP-9, ou des deux enzymes.

- A. Ajout de 200 μM d'inhibiteur de MMP-2 ou de 20 μM d'inhibiteur de MMP-9 dans le tampon d'activation.
- B. Ajout de 2 mM d'inhibiteur de MMP-2 dans le tampon d'activation.
- C. Ajout de 2 μM d'inhibiteur de MMP-9 dans le tampon d'activation.
- D. Ajout de 1 mM d'inhibiteur de MMP-2 ou 10 μM d'inhibiteur de MMP-9 dans le tampon d'activation.
- E. Ajout de 25 μM ou 100 μM d'inhibiteur combiné de MMP-2 et de MMP-9 dans le tampon d'activation.
- F. Récapitulatif de l'identification des protéases présentes dans les bandes de dégradation.

les bandes détectées sont des métalloprotéinases (MMPs), nous avons ajouté de l'EDTA dans le tampon permettant l'activation des enzymes au sein du gel (Figure III.16). L'EDTA, étant un puissant chélateur de cations, empêche l'activité des MMPs nécessitant du Ca^{2+} pour être fonctionnelles. On observe que l'ajout de 20 mM d'EDTA dans le tampon d'activation empêche l'activité de toutes les protéases présentes dans le milieu des cellules endothéliales ; ceci supposant que toutes les protéases à l'origine de ces bandes de dégradation dans le gel sont des MMPs.

Avec cette information en poche, des inhibiteurs spécifiques de la MMP-2 ou de la MMP-9 ainsi qu'un inhibiteur combiné, inhibant simultanément l'activité des deux enzymes ont alors été utilisés en les ajoutant directement dans le tampon d'activation (Figure III.17). Différentes concentrations ont été testées afin de s'assurer qu'une concentration trop forte ne puisse inhiber de manière aspécifique l'activité des autres enzymes et inversement, qu'une concentration trop faible n'empêche l'inhibition. Pour commencer, des concentrations de 200 μM d'inhibiteur de MMP-2 et de 20 μM d'inhibiteur de MMP-9 ont été choisies sur base des IC_{50} ³ renseignés dans les fiches techniques (Figure III.17.A). La concentration de l'inhibiteur de MMP-2 semble trop faible tandis que celle de l'inhibiteur de MMP-9 est peut-être un peu trop forte. Néanmoins, on peut déjà supposer que 3 des bandes observées pourraient provenir de l'activité de la MMP-9. Les concentrations ont alors été réadaptées et une concentration de 2 mM de l'inhibiteur de MMP-2 a été utilisée (Figure III.17.B). A cette concentration, la grosse bande noire disparaît complètement alors que les 4 autres bandes nettement plus fines sont toujours observables ; ceci voulant dire que les 4 premières bandes ne proviennent pas de l'activité de la MMP-2 au contraire de la dernière bande. Ensuite, une concentration plus faible, 2 μM , de l'inhibiteur de MMP-9 a été essayée mais cette concentration est trop faible et n'entraîne la disparition d'aucune des bandes (Figure III.17.C). Enfin, pour être sûr de l'identification des enzymes responsables des bandes, des concentrations intermédiaires pour les deux inhibiteurs ont été utilisées avec 1 mM pour l'inhibiteur de MMP-2 et 10 μM pour l'inhibiteur de MMP-9 (Figure III.17.D). La concentration de 1 mM de l'inhibiteur de MMP-2 n'est pas efficace et ne fait disparaître aucune des bandes tandis que la concentration de 10 μM de l'inhibiteur de MMP-9 entraîne la disparition des 2 premières bandes et de la 4^{ème}. Néanmoins, la 3^{ème} bande ne disparaît avec aucun des deux inhibiteurs à aucune des concentrations testées. Un inhibiteur combiné capable d'inhiber l'activité de la MMP-2 et de la MMP-9 simultanément a alors été utilisé à deux concentrations, 25 μM et 100 μM , afin de vérifier que cette bande n'est pas due à l'activité d'une de ces deux enzymes (Figure III.17.E). De façon concordante avec les résultats des expériences précédentes, la 3^{ème} bande est toujours présente même à très forte concentration de l'inhibiteur. En conclusion, les deux premières bandes et la 4^{ème} bande représentent l'activité de la MMP-9, l'enzyme responsable de la 3^{ème} bande n'est pas encore déterminée et la dernière bande est due à l'activité de la MMP-2 (Figure III.17.F). Les poids moléculaires de ces enzymes ne sont pas bien définis dans la littérature. Les plus couramment admis tournent aux environs de 72 kDa pour la pro-MMP-2, 62 kDa pour MMP-2, 92 kDa pour la pro-MMP-9 et 82 kDa pour la MMP-9. Sur base de ces poids moléculaires, on remarque d'emblée que la bande représentant l'activité de la MMP-2 ne se trouve ni à 72 ni à 62 kDa et qu'aucune des bandes représentant l'activité de la MMP-9 ne se trouve à 82 ou 92 kDa. Néanmoins, Grayson et al. ont montré la présence d'une forme active de MMP-2 à 55 kDa dans le fluide gingival (Grayson et al., 2003). Par ailleurs pour MMP-9, Makowski et al. ont observé la présence de trois formes produites par les neutrophiles dans le fluide synovial de l'arthrite rhumatoïde ayant des poids moléculaires de 92, 130 et 225 kDa (Makowski and Ramsby, 2005). Ces deux dernières formes semblent

³ Le IC_{50} représente la concentration nécessaire pour inhiber à moitié l'activité d'une enzyme.

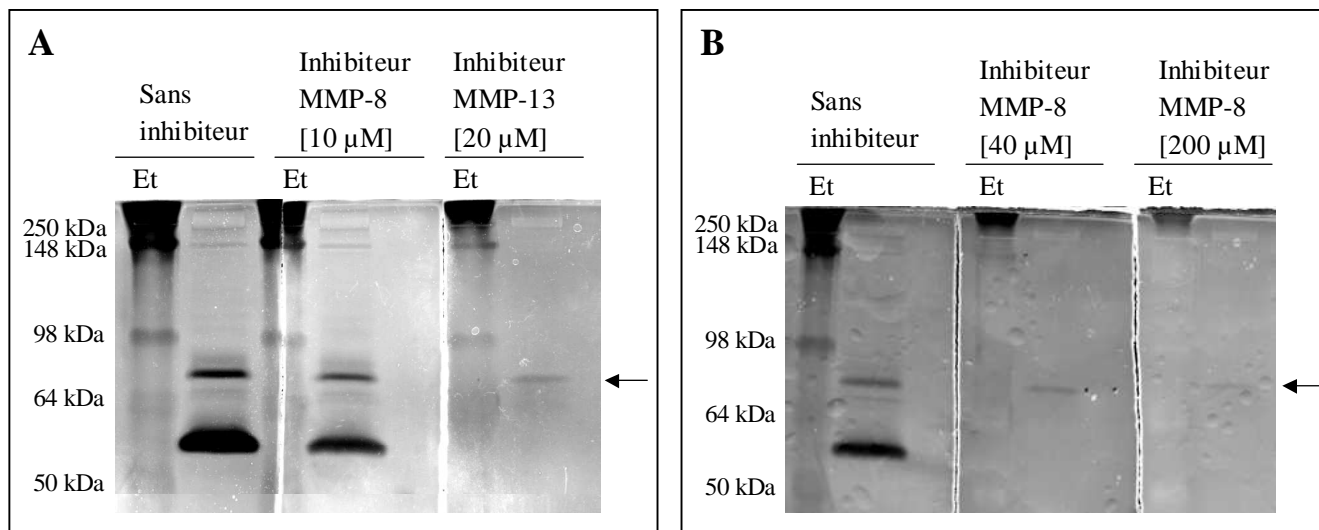


Figure III.18 : Identification des protéases observées sur les zymogrammes - Utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MMP-8 et de MMP-13.

A. Ajout de 10 µM d'inhibiteur de MMP-8 ou 20 µM d'inhibiteur de MMP-13 dans le tampon d'activation.

B. Ajout de 40 µM ou 200 µM d'inhibiteur de MMP-8 dans le tampon d'activation.

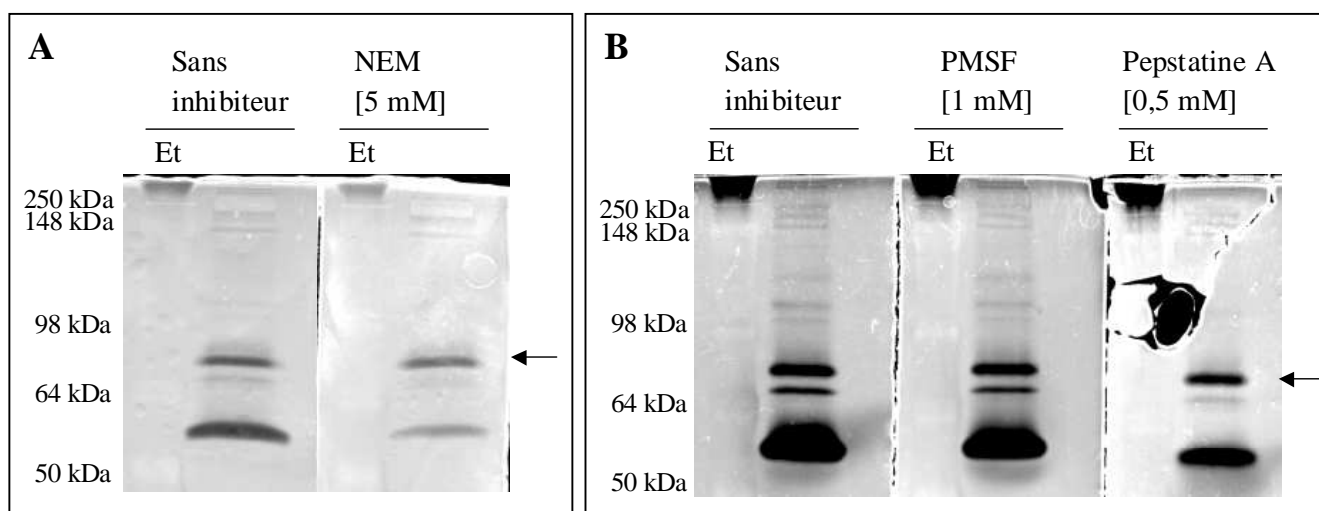


Figure III.19 : Identification des protéases observées sur les zymogrammes - Utilisation d'inhibiteurs d'autres types de protéases.

A. Ajout de 5 mM de NEM, inhibiteur des cystéinyl protéases, dans le tampon d'activation.

B. Ajout de 1 mM de PMSF, inhibiteur des sérine protéases, ou de 0,5 mM de pepstatine A, inhibiteur des aspartyl protéases, dans le tampon d'activation.

tout à fait correspondre aux deux premières bandes observées, validant l'identification de la MMP-9 comme étant l'enzyme responsable de la dégradation de la gélatine à ces endroits du gel. Ces hauts poids moléculaires des protéines isolées à partir de neutrophiles sont expliqués par Triebel et al. (Triebel et al., 1992). Ceux-ci ont montré que la forme à 125-130 kDa représente un hétérodimère (lien covalent) entre la pro-MMP-9 (92 kDa) et une protéine de 25 kDa qu'ils ont ensuite identifié comme étant l'alpha 2-microglobuline, aussi appelée lipocaline 2 ou NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin). La forme de 220-225 kDa vient quant à elle de la dimérisation des formes de 125 kDa (Gupta et al., 2007; Triebel et al., 1992). En formant ce complexe NGAL/MMP-9, NGAL protège MMP-9 de la dégradation protéolytique, mécanisme fondamental contrôlant l'activité de l'enzyme, et augmente dès lors l'activité enzymatique de la MMP-9 et donc l'invasion tumorale (Bolognani et al., 2010). Dans notre cas, tous les milieux contiennent ce complexe même ceux récoltés de cellules incubées en N, ce qui peut probablement être expliqué par l'immortalisation des cellules endothéliales par fusion avec la lignée cancéreuse A549 leur conférant l'expression du NGAL.

Afin d'essayer d'identifier l'enzyme responsable de la 3^{ème} bande du zymogramme, qui par ailleurs est la plus intéressante puisque c'est elle dont l'activité augmente en HI seule à 6h+16hR et 6h+24hR par rapport à la N et l'HC, nous nous sommes intéressés aux MMPs de type collagénase, MMP-8 et MMP-13. En effet, comme déjà expliqué, la gélatine utilisée comme substrat pour le zymogramme n'a pas une composition pure. De plus, la gélatine n'est pas dégradée que par les gélatinases mais dans une plus grande mesure, également par d'autres MMPs comme les collagénases (Cleutjens et al., 1995). Dès lors, des inhibiteurs de la MMP-8 et de la MMP-13 ont été ajoutés dans le tampon d'activation (Figure III.18). L'inhibiteur de MMP-8 a tout d'abord été utilisé à 10 µM et l'inhibiteur de MMP-13 à 20 µM (Figure III.18.A). Aucune bande ne disparaît en présence de l'inhibiteur de MMP-8 suggérant qu'une plus grande concentration doit être testée. Par contre, en présence de l'inhibiteur de MMP-13, toutes les bandes dépendant de l'activité des MMP-2 et MMP-9 disparaissent sauf celle d'intérêt, suggérant que même avec une grande spécificité de l'inhibiteur, l'enzyme d'intérêt est toujours active. Cette bande ne peut donc pas représenter l'activité de la MMP-13. Ensuite, deux concentrations plus fortes de l'inhibiteur de MMP-8 ont été utilisées, 40 µM et 200 µM (Figure III.18.B). Toutes les bandes disparaissent sauf celle d'intérêt signifiant que l'enzyme responsable de cette bande de dégradation ne peut pas être la MMP-8, puisque les activités enzymatiques des MMP-2 et MMP-9 sont inhibées spécifiquement.

Puisque nous n'avons toujours pas réussi à identifier l'enzyme d'intérêt, la nature de la protéase présente dans la bande observée à environ 70 kDa a été remise en question. En effet, il se pourrait que cette enzyme ait été inactivée par l'EDTA sans être pour autant une MMP. Dès lors, des inhibiteurs d'autres types de protéases ont été ajoutés dans le tampon d'activation. Le problème est qu'aucun contrôle positif ne permet de vérifier l'efficacité de ces inhibiteurs. Les résultats ne pourront nous aider que s'ils vont dans le sens d'une inhibition de l'activité enzymatique puisque si la bande est toujours présente, cela peut être dû à la non-efficacité de l'inhibiteur suite à l'utilisation d'une concentration trop faible. Les inhibiteurs utilisés sont le N-éthylmaleimide (NEM) inhibant les cystéinyl protéases, le phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) inhibant les sérine protéases et la pepstatine A inhibant les aspartyl protéases (Figure III.19). Aucun de ces trois inhibiteurs n'entraîne la disparition de la bande d'intérêt. Nous ne pouvons donc rien dire de plus concernant la nature de l'enzyme.

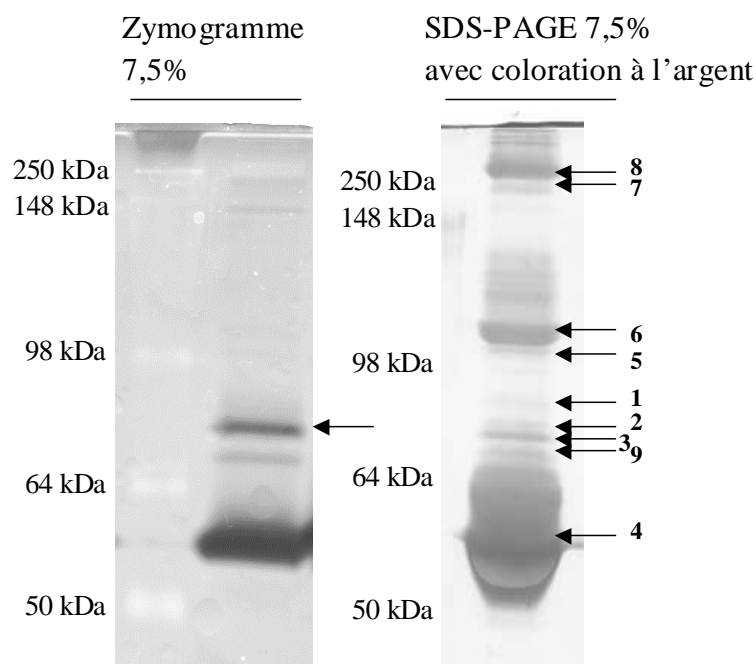


Figure III.20 : Identification des protéases observées sur les zymogrammes - Utilisation de la spectrométrie de masse.

Un même échantillon de milieu d'incubation a été chargé sur un zymogramme et sur un gel SDS-PAGE 7,5% afin de comparer le profil de migration de la bande d'intérêt. Le gel SDS-PAGE a été coloré à l'argent grâce à une méthode compatible avec la spectrométrie de masse afin de détecter les protéines présentes dans le milieu des cellules. Neuf bandes ont été directement découpées sur le gel SDS-PAGE. Ces neuf bandes ont ensuite été digérées avec de la trypsine et les fragments des peptides ont d'abord été séparés sur une colonne de chromatographie de type nanoLC, et puis analysés par spectrométrie de masse de type ESI-TOF. Les données brutes ont ensuite été traitées avec le logiciel d'analyse protéomique « Protein Scafe » qui utilise le moteur de recherche « Mascot » afin d'identifier les protéines présentes dans chaque bande découpée du gel.

Les deux protéines en jaune sont les protéines qui semblent les plus intéressantes étant donné que les autres protéines sont soit synthétisées par le foie, soit retrouvées dans le plasma, soit typiquement bovines ou soit synthétisées par d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales.

×	×
---	---

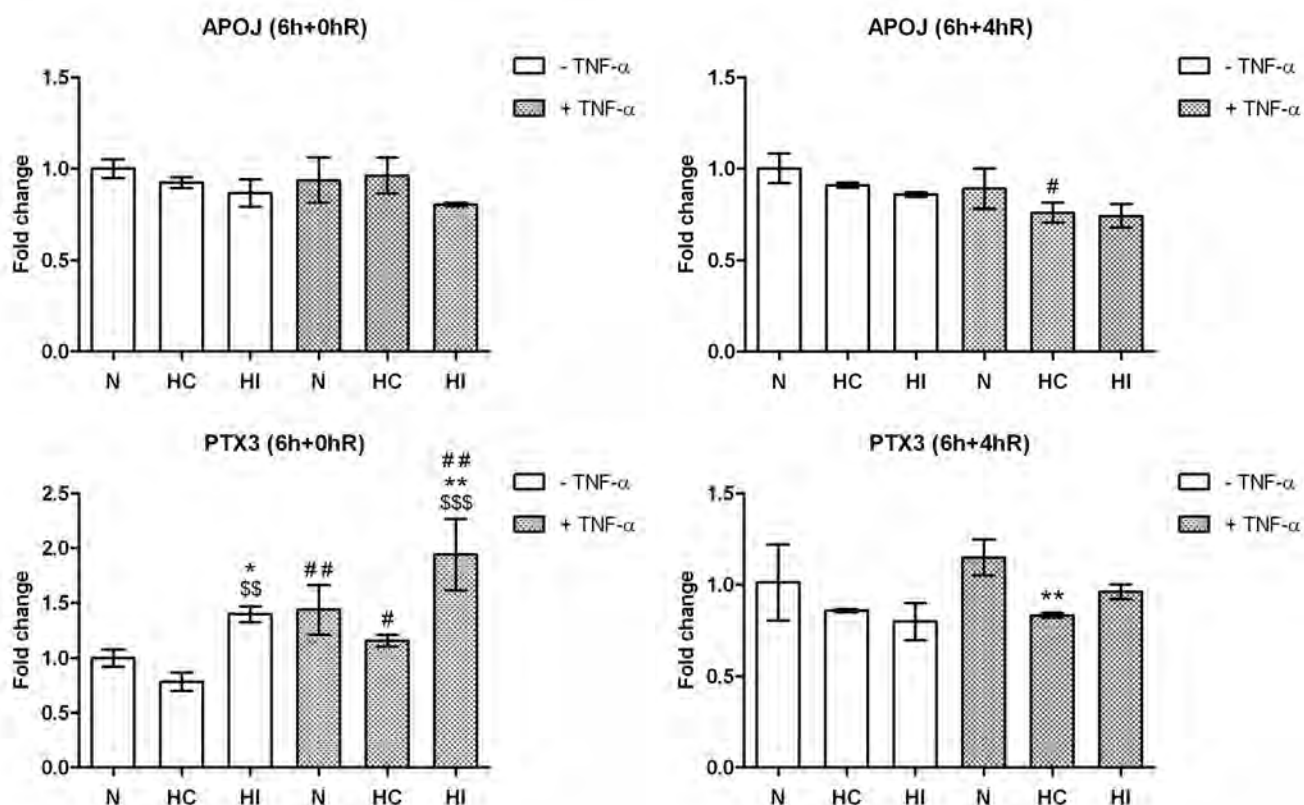


Figure III.21 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur l'expression en ARNm de APOJ (clusterine) et PTX3 (pentraxine 3) à 6h+0hR et à 6h+4hR.

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 4h de réoxygénation (6h+4hR), l'ARN est extrait et rétro-transcrit en ADNc. Une PCR en temps réel a été réalisée et les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées avec les valeurs de Ct de RPL13A (HKG). Les résultats sont exprimés en « fold change » par rapport à la condition contrôle (N) (moyenne \pm 1 écart-type). L'expérience a été réalisée sur trois extraits différents. Les résultats ont été statistiquement analysés par une ANOVA 2.

* HC/HI vs N correspondant

* p<0,05 ; ** p<0,01 ; *** p<0,001

\$ HI vs HC correspondant

\$ p<0,05 ; \$\$ p<0,01 ; \$\$\$ p<0,001

TNF- α vs CTL pour la même pO₂

p<0,05 ; ## p<0,01 ; ### p<0,001

Après l'utilisation d'inhibiteurs, la spectrométrie de masse s'est alors révélée comme technique de choix pour l'identification sans *a priori* de l'enzyme d'intérêt. Néanmoins, la bande contenant la protéine à identifier ne peut pas être directement découpée à partir du zymogramme. En effet, la gélatine et les autres peptides issus du collagène sont beaucoup trop abondants et rendraient l'identification d'autres peptides à partir du gel de zymographie impossible. Pour contrer ce problème, une coloration à l'argent compatible avec la spectrométrie de masse sur un gel SDS-PAGE a été envisagée. La coloration à l'argent permet de révéler toutes les protéines présentes sur le gel. Dès lors, le même échantillon a été chargé sur un gel classique de zymographie et sur un gel SDS-PAGE contenant 7,5% d'acrylamide afin de comparer les profils de migration des protéines sur les deux gels et ainsi espérer localiser l'endroit approximatif de la protéine d'intérêt. Neuf bandes du gel SDS-PAGE ont finalement été découpées avec les bandes 1, 2, 3 étant les plus probables de contenir la protéase d'intérêt (Figure III.20). Les autres bandes ont été découpées afin de vérifier si la MMP-2 et la MMP-9 sont également retrouvées ; ce qui servirait de « contrôles positifs ». Les 9 bandes de gel ont ensuite été traitées avec de la trypsine, digérant « in-gel » les protéines en peptides. Il faut préciser qu'au vu des nombreuses bandes révélées par la coloration à l'argent et de la séparation uniquement en 1D, chaque bande découpée contient probablement beaucoup plus qu'une seule protéine. Ceci a été confirmé par l'analyse des données brutes, obtenues par le spectromètre de masse avec le logiciel « Protein Scape » utilisant le moteur de recherche « Mascot ». Le Tableau III.1 répertorie toutes les protéines retrouvées dans chaque bande de gel. Une même protéine se retrouve dans plusieurs bandes et ceci pour plusieurs protéines différentes, signifiant qu'en fonction de leurs interactions avec d'autres protéines, leur migration dans le gel peut être modifiée. Parmi toutes ces protéines identifiées, aucune ne possède une activité de dégradation matricielle. De plus, ni la MMP-2 ni la MMP-9 ne sont retrouvées. Ceci peut être expliqué par la très faible quantité de ces enzymes sur le gel ; c'est d'ailleurs pour cette raison qu'on utilise plutôt un zymogramme qui évalue l'activité plutôt qu'un western blot qui évalue l'abondance protéique. En effet, les enzymes sont activées pendant 20h pour arriver à voir les bandes telles qu'on les observe ; une très faible quantité d'enzymes est responsable de la dégradation observée. En plus de l'absence de toute protéase, énormément de protéines répertoriées dans ce tableau sont soit normalement synthétisées au niveau du foie ou d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales, soit sont couramment retrouvées dans le plasma ou sont typiquement bovines. Ces protéines viennent donc du milieu de culture. Le milieu CO₂ indépendant utilisé pour les incubations est dépourvu de sérum, mais sa composition n'est pas divulguée par le fournisseur Gibco. Il pourrait donc contenir certaines protéines. Il se pourrait également que ces protéines viennent du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum et que les puits des boîtes de culture, malgré le changement de milieu, contiennent toujours un peu de protéines. On retrouve également dans cette liste le TNF- α ajouté pour l'incubation des cellules. Cependant, après analyse de toutes les protéines répertoriées dans le tableau, deux d'entre elles se sont révélées intéressantes puisqu'il est possible que les cellules EAhy926 les synthétisent : la pentraxine 3 (PTX3) et la clusterine (aussi appelée APOJ). Leur expression génique a alors été mesurée en PCR quantitative. Ces deux gènes présentent des valeurs de Ct très basses signifiant un taux élevé d'ARNm de PTX3 et d'APOJ dans les cellules EAhy926 (données non montrées) (Figure III.21). L'expression d'APOJ, gène notamment impliqué dans la protection contre les ROS (Shin et al., 2009), ne montre aucune variation importante ni à 6h+0hR ni à 6h+4hR. Par contre, le niveau d'expression en ARNm de PTX3, gène notamment impliqué dans l'inflammation, augmente en HI par rapport à la N et l'HC en absence de TNF- α à 6h+0hR. La présence du TNF- α induit aussi une augmentation de son taux de transcrits en N, HC, HI et cette induction par le TNF- α est davantage augmentée en HI par rapport à la N et l'HC ;

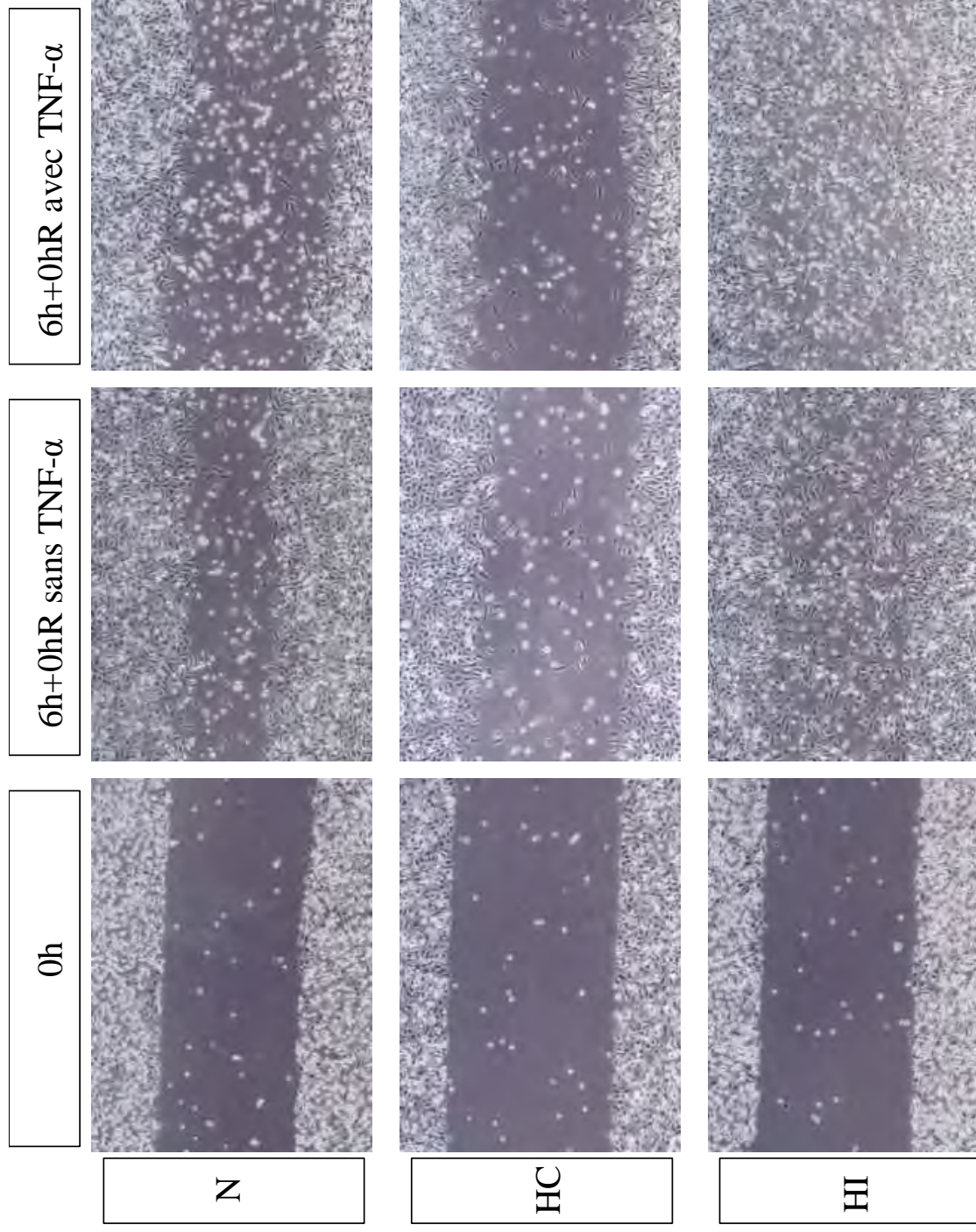


Figure III.22 : Effets de l'hypoxie intermittente ou chronique en présence ou non de TNF- α sur la migration des cellules endothéliales à 6h+0hR. La migration des cellules endothéliales a été étudiée en réalisant des scratches, représentant une blessure, dans une monocouche de cellules confluentes. Les cellules ont été rincées 2x au PBS, placées dans du milieu CO₂ indépendant et des photos des scratches ont été prises avant l'incubation (0h). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α à 0,1 ng/ml. Des photos des scratches ont alors été prises de manière aléatoire directement après les 6h d'incubation (6h+0hR).

suggérant un effet cumulatif de l'HI et du TNF- α sur l'expression génique de PTX3. Ces variations ne sont plus retrouvées à 6h+4hR.

En conclusion, nous n'avons pas réussi à identifier la protéase d'intérêt présentant une activité augmentée en HI seule à 6h+16hR. Toutefois, la spectrométrie de masse nous a indiqué une sécrétion de la pentraxine-3 par les cellules EAhy926. L'étude en RT-PCR quantitative de PTX3 a ensuite montré une augmentation de son expression génique en HI seule par rapport à la N et l'HC et une induction de son expression génique par le TNF- α , davantage augmentée en HI par rapport à la N et l'HC.

3ème partie : Etude fonctionnelle des effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur le comportement migratoire des cellules endothéliales

Après avoir démontré des effets pro-angiogéniques de l'HI en présence ou en absence de TNF- α dans les cellules endothéliales, une étude fonctionnelle a été réalisée dans le but d'étudier l'impact de ces effets sur le comportement migratoire des cellules endothéliales. Ainsi, nous avons choisi d'étudier la migration des cellules endothéliales à l'aide d'un scratch assay en N, HC et HI en présence ou en absence de TNF- α . Les effets de l'HI mais pas ceux du TNF- α sur la migration des cellules endothéliales avaient déjà été étudiés à l'aide d'un scratch assay, montrant qu'après 5h30 d'incubation (n'incluant pas la dernière réoxygénation), cette migration était nettement augmentée en HI par rapport à la N et diminuée en HC par rapport à la N (Toffoli et al., 2009). Pour confirmer ces résultats après 6h d'incubation cette fois (6h+0hR) et pour investiguer les effets du TNF- α sur la migration, des scratches correspondant à des blessures ont été réalisés dans une monocouche de cellules endothéliales. Des cellules confluentes sont utilisées afin de s'assurer que ce qu'on observe est bien dû à une migration et pas une prolifération (même si les cellules sont incubées dans du milieu sans sérum) (Figure III.22). Des photos des scratches ont été prises avant de commencer l'incubation montrant que pratiquement plus aucune cellule ne se retrouve dans la zone dénudée de cellules (0h). Ensuite, de nouvelles photos ont été prises après les 6h d'incubation en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Les observations montrent que l'HI augmente la migration des cellules endothéliales par rapport à la N alors que l'HC la réduit ; ce qui correspond aux résultats obtenus par Toffoli et al (Toffoli et al., 2009). Le TNF- α ne semble pas fortement augmenter la migration ; un petit effet positif peut juste être retenu.

En conclusion, ces résultats illustrent l'importance des effets de l'HI sur le comportement migratoire des cellules endothéliales indépendamment de la présence ou de l'absence de TNF- α . Néanmoins, aucun des résultats obtenus jusqu'à présent quant à une augmentation de l'expression des protéines étudiées ne peut expliquer cette augmentation de migration. En effet, la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 augmentée en HI à 6h+0hR dépend de la présence de TNF- α , l'augmentation de la sécrétion du bFGF n'augmente qu'à 6h+16hR en HI et dépend aussi de la présence de TNF- α et l'activité de la protéase d'intérêt n'est augmentée en HI qu'à 6h+16hR. Seules l'augmentation de l'abondance du bFGF observée en immunofluorescence en HI à 6h+0hR par rapport à la N et l'HC en absence de TNF- α ainsi que la légère augmentation de la localisation nucléaire en HI à 6h+0hR pourraient éventuellement intervenir dans l'explication de cette augmentation de la migration des cellules endothéliales en HI à 6h+0hR. Bien sûr, d'autres protéines non étudiées dans ce travail pourraient participer à cet effet et devront être étudiées dans la suite de ce mémoire.

1) Discussion et perspectives

Le cancer est maintenant bien défini comme une maladie impliquant de nombreuses interactions hétérotypiques essentielles à sa progression. Les cellules endothéliales constituent des acteurs de premier plan dans le développement tumoral et la dissémination des métastases. La modification du comportement de ces cellules peut alors influencer de façon notoire la croissance tumorale. Ces cellules sont essentiellement soumises à deux facteurs environnementaux principaux que sont l'hypoxie intermittente et l'inflammation. En effet, l'architecture peu fonctionnelle du réseau sanguin tumoral les soumet à une hypoxie intermittente. Elles sont de plus plongées dans un environnement inflammatoire perpétuel présent au niveau du site tumoral. Ces deux caractéristiques induisent, par l'activation d'une série de facteurs de transcription, l'acquisition d'un phénotype favorisant l'inflammation et l'angiogenèse par les cellules endothéliales tumorales. Dans le cadre de cette étude, les voies de signalisation et les facteurs de transcription induits par ces effets n'ont pas été investigués et nous ne pourrions donc pas répondre aux questions moléculaires des changements observés. Ainsi, seules des modifications transcriptomiques et protéomiques induites par l'hypoxie intermittente indépendamment ou dépendamment du TNF- α par rapport à la normoxie ou l'hypoxie chronique ont été étudiées.

Les premières recherches réalisées ont tout d'abord montré que l'HI, indépendamment du TNF- α ou combinée au TNF- α , entraîne la surexpression en ARNm de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation et/ou l'angiogenèse à savoir **ICAM-1**, **IL-6**, **IL-8** et **bFGF**. L'HC n'engendre, sur aucun de ces gènes, les mêmes effets que l'HI ; ceci soulignant les effets distincts de ces deux types d'hypoxie sur les cellules. D'une part, deux de ces quatre gènes, l'IL-8 et ICAM-1, sont surexprimés à 6h+0hR en HI en présence de TNF- α . Ceux-ci sont donc régulés rapidement et probablement au niveau transcriptionnel par ces conditions environnementales. L'augmentation de l'expression en ARNm de l'IL-8 par la stimulation au TNF- α est bien connue et a été montrée pour être nettement plus élevée que celle induite par la stimulation avec d'autres facteurs comme l'IL-1 β , LIF, IL-6, IL-8 et IFN- β dans des cellules de carcinome pancréatique *in vitro*. La surexpression en ARNm de l'IL-8 par le TNF- α ne dépend pas de la stabilité de l'ARNm mais plutôt de l'augmentation de sa synthèse *de novo* (Kamohara et al., 2007). L'IL-8 est donc rapidement sécrétée et peut initier une nouvelle stimulation autocrine des cellules. Les voies de signalisation induites par l'IL-8 sont nombreuses et conduisent à l'activation de divers facteurs de transcription pouvant mener à l'expression plus tardive d'autres gènes. D'autre part, l'IL-6 et le bFGF ne sont, quant à eux, surexprimés qu'à 6h+4hR en HI et indépendamment du TNF- α . Ces gènes ne sont donc pas régulés transcriptionnellement par le TNF- α . Leur surexpression tardive ne peut donc pas provenir de l'augmentation de l'IL-8 qui elle est dépendante du TNF- α . Les quatre gènes cités précédemment ne font partie que de trois des quatre classes de gènes étudiés. La dernière classe, représentée par les gènes codant pour des protéines impliquées dans le remodelage matriciel, ne montre aucune variation intéressante en HI seule ou en présence de TNF- α . Néanmoins, les variations d'expression en ARNm n'ont été testées que sur quelques gènes cibles. Il est évident qu'un nombre beaucoup plus grand de gènes répondent positivement à l'HI indépendamment ou dépendamment du TNF- α . L'utilisation de cartes microfluidiques permettrait d'étudier les variations d'expression de 96 gènes simultanément augmentant ainsi le nombre de gènes analysés et par la même occasion la probabilité de mettre en évidence des gènes susceptibles de nous intéresser. De plus, les miR-132 et miR-212 présentent peut-être une expression augmentée en HI en présence de TNF- α qui pourrait éventuellement expliquer la forte diminution de l'expression génique de MMP-9, une nouvelle cible de ces miRNAs

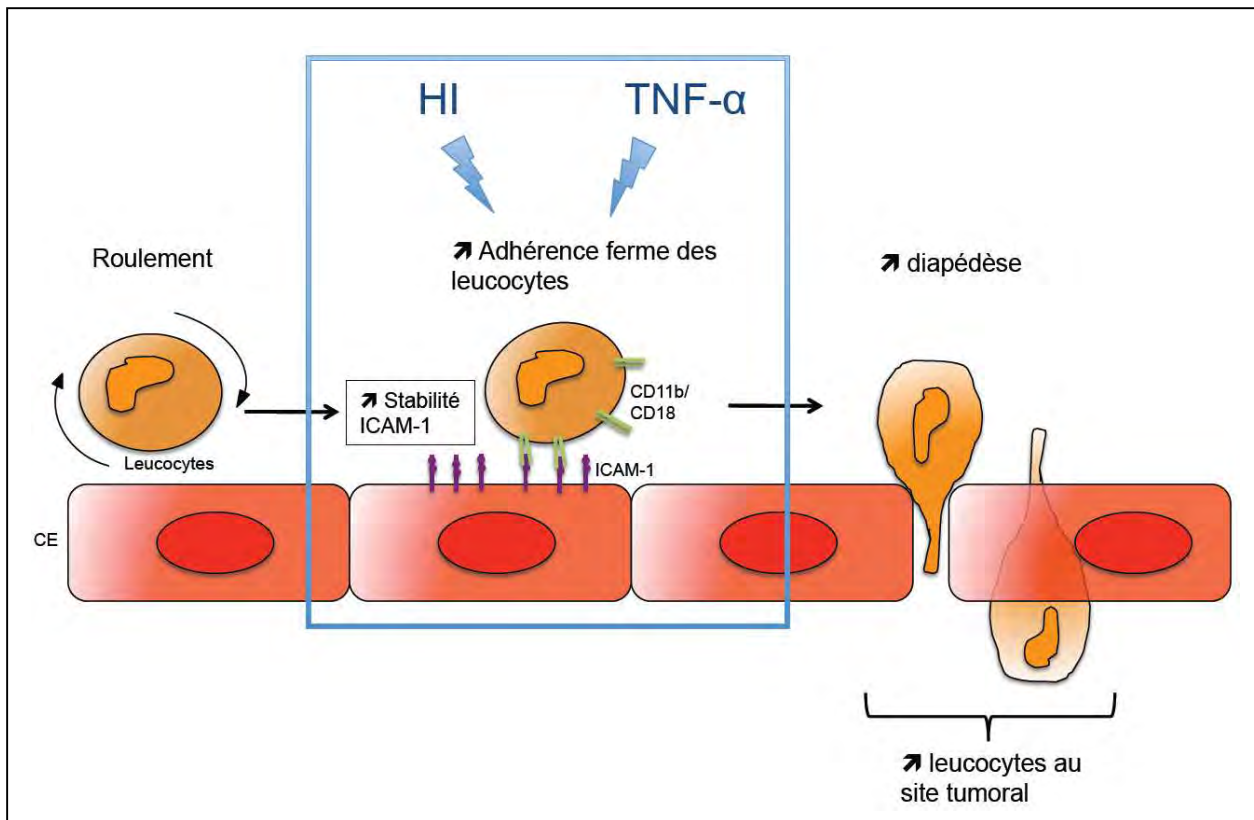


Figure IV.1 : Représentation des conséquences possibles de l'effet combiné de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression protéique de ICAM-1 par les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales exposées à une hypoxie intermittente et au TNF- α présentent une stabilité de l'expression élevée de ICAM-1. Dans une tumeur, cette expression soutenue de ICAM-1 pourrait conduire à une augmentation de l'adhérence des leucocytes ainsi qu'à une augmentation de leur diapédèse. En conclusion, l'hypoxie intermittente et le TNF- α engendrent un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales, participant à l'amplification de l'inflammation présente au site tumoral.

CE : cellules endothéliales ; HI : hypoxie intermittente

(Ucar et al., 2010). Il serait donc intéressant de tester leur expression dans les cellules incubées en présence des différentes conditions étudiées. Sur base des résultats obtenus au niveau ARNm, nous nous sommes concentrés sur l'étude protéique de ICAM-1, IL-6, IL-8 et bFGF pour la suite de la caractérisation des effets de l'HI combinée ou non au TNF- α .

En vue de visualiser l'expression protéique de **ICAM-1**, un marquage en immunofluorescence a été effectué à 6h+0hR et dans une expérience indépendante à 6h+4hR et à 6h+16hR. Ce marquage montre que l'HI stabilise l'abondance protéique induite par le TNF- α , au contraire de la N et de l'HC qui induisent un signal plus faible au cours du temps de réoxygénation. Ensuite, pour confirmer l'expression plus élevée de ICAM-1 en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+16hR, son abondance a été évaluée de manière plus quantitative à l'aide d'une révélation en western blot. Les résultats obtenus confirment une abondance de ICAM-1 supérieure en HI à 6h+16hR par rapport à la N et l'HC en présence de TNF- α . Ces résultats sont d'une importance cruciale : même si l'HI ne touche une partie de la tumeur et de son réseau vasculaire que pendant quelques heures consécutives, elle stabiliserait l'expression de ICAM-1 pendant au moins 16h. Ces données sont d'autant plus importantes que la glycoprotéine ICAM-1, exprimée typiquement à la surface des cellules endothéliales et des cellules immunes, peut se lier aux intégrines CD11b/CD18 ; phénomène intervenant dans l'adhérence ferme des leucocytes aux cellules endothéliales et constituant l'étape précédente à la diapédèse. ICAM-1 est donc essentielle à la migration transendothéliale des leucocytes. Ainsi, si l'expression de ICAM-1 est stable et élevée en surface des cellules endothéliales, le recrutement de leucocytes au site tumoral est d'autant plus augmenté, faisant alors intervenir les cellules endothéliales dans l'amplification de l'inflammation liée au cancer. Or, comme expliqué dans le point I.3, l'inflammation est bien souvent un partenaire du développement cancéreux et non son ennemi. Dès lors, l'effet combiné de l'HI et du TNF- α sur l'augmentation de l'expression génique et protéique de ICAM-1 induit un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales menant au recrutement de nombreux leucocytes et augmentant l'inflammation intratumorale (Figure IV.1). Afin de vérifier la conséquence physiologique des effets de ces deux facteurs sur l'inflammation, l'adhérence de leucocytes, par exemple des monocytes humains THP-1, aux cellules endothéliales devra être évaluée à différents temps de réoxygénation.

Pour poursuivre l'étude du phénotype pro-inflammatoire et commencer la caractérisation du phénotype pro-angiogénique acquis par les cellules endothéliales exposées à l'HI et dépendant ou non de la présence de TNF- α , la sécrétion des deux cytokines **IL-6** et **IL-8** a été mesurée. Leur sécrétion est fortement stimulée par le TNF- α et de façon significativement plus élevée en HI qu'en N et HC (à 6h+0hR et à 6h+16hR). Ces deux cytokines démontrent donc un profil de sécrétion plus ou moins similaire. Néanmoins, cette sécrétion augmentée en HI de façon dépendante du TNF- α corrèle avec l'expression en ARNm de l'IL-8 mais pas avec celle de l'IL-6 qui ne varie pas en fonction de la présence ou l'absence de TNF- α . L'expression de l'IL-6 semble donc être régulée de manière post-transcriptionnelle par le TNF- α . L'absence de corrélation entre le niveau génique et le niveau protéique de l'IL-6 avait déjà été montrée par Polotsky et al. sur des cellules endothéliales aortiques humaines (HAEC). En effet, ils ont constaté une augmentation de la sécrétion d'IL-6 en hypoxie intermittente (mimée par 6 cycles d'hypoxie (5 min)/réoxygénation (5 min) par heure pendant 8h) sans variation de l'expression des ARNm alors que la sécrétion d'IL-8 suit son profil d'expression génique, tout comme nous l'avons également remarqué (Polotsky et

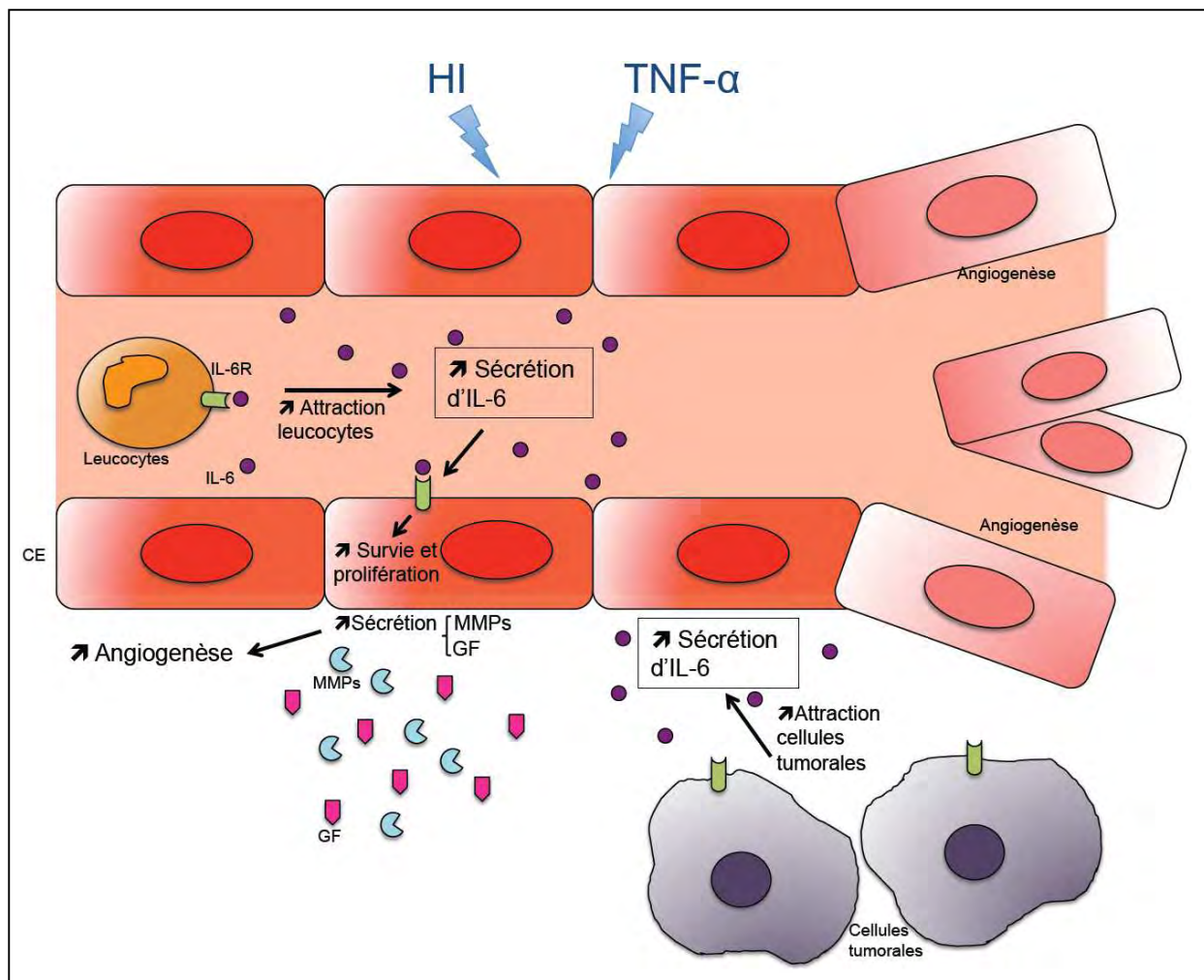


Figure IV.2 : Représentation des conséquences possibles de l'effet combiné de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales exposées à une hypoxie intermittente et au TNF- α sécrètent davantage d'IL-6. L'IL-6 est impliquée dans l'attraction des leucocytes, dans la survie et la prolifération cellulaire, dans l'induction de la sécrétion de facteurs de croissance et de MMPs ainsi que dans l'attraction des cellules tumorales. Par cet effet, l'hypoxie intermittente et le TNF- α engendrent donc un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules endothéliales puisque l'attraction des leucocytes amplifie l'inflammation du site tumoral et que la prolifération des cellules endothéliales et leur sécrétion de MMPs soutiennent l'angiogenèse. De plus, les cellules endothéliales, par une sécrétion d'IL-6 élevée, attirent les cellules tumorales et facilitent ainsi leur dissémination.

CE : cellule endothéliale ; GF : facteur de croissance ; HI : hypoxie intermittente ; IL-6R : récepteur de l'IL-6

al., 2010). Néanmoins, ils ne proposent pas d'explications concrètes de cette discordance entre l'expression au niveau en ARNm et au niveau protéique.

La sécrétion d'**IL-6** quasiment doublée en HI en présence de TNF- α à 6h+16hR est très intéressante au vu des rôles pléiotropiques que joue cette cytokine dans la réponse immunitaire, l'inflammation (une des trois molécules inflammatoires principales du site tumoral avec le TNF- α et l'IL-1 β) et l'hématopoïèse. La liaison de l'IL-6 à son récepteur conduit à l'activation des facteurs de transcription NF-IL6 et STATs dont essentiellement STAT3 (Hong et al., 2007). STAT3 induit notamment l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire comme la cycline D1 et Bcl-X_L, dans l'angiogenèse comme le VEGF et le bFGF, dans le remodelage matriciel comme MMP-2 et MMP-9, et dans la diminution de la réponse immunitaire comme l'IL-10 (Huang, 2007). La sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales favorise donc l'angiogenèse via l'induction de leur propre prolifération et de leur sécrétion d'enzymes de dégradation de la MEC nécessaires à leur migration et à leur association en structures tubulaires. En outre, l'IL-6 maintient également l'état d'inflammation chronique via l'attraction de monocytes et lymphocytes (Rose-John et al., 2006). De plus, Badache et Hynes ont montré que l'IL-6 induit la migration des cellules de carcinome du sein humain T47D évaluée à l'aide d'une chambre de Boyden et peut donc jouer le rôle de chémoattractant pour les cellules tumorales (Badache and Hynes, 2001). Dès lors, la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales pourrait faciliter la dissémination de métastases par l'attraction des cellules tumorales jusqu'aux vaisseaux sanguins. C'est la raison pour laquelle le milieu des cellules endothéliales incubées pendant 6h en N, HC et HI pourrait être utilisé dans une nouvelle étude fonctionnelle afin d'évaluer la migration de différents types cellulaires cancéreux présents au laboratoire. Enfin, la concentration sérique en IL-6 a tout récemment été mise en évidence comme étant un indicateur pronostique dans le cancer colorectal. En effet, une méta-analyse a révélé que les patients souffrant du cancer colorectal ont une concentration sérique en IL-6 beaucoup plus élevée que les personnes saines. De plus, la quantité d'IL-6 dans le sérum des patients est proportionnelle au développement de la tumeur et inversement proportionnelle à la survie du patient (Knupfer and Preiss, 2010). En conclusion, l'augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les cellules endothéliales exposées à l'HI et au TNF- α facilite l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales et amplifie l'état pro-inflammatoire de la tumeur (Figure IV.2).

Les cellules endothéliales exposées aux effets combinés de l'HI et du TNF- α sécrètent également davantage d'**IL-8**, caractérisant aussi un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique. En effet, l'IL-8 (aussi appelé CXCL-8) est un des médiateurs majeurs de la réponse inflammatoire en fonctionnant comme molécule chémoattractive pour les leucocytes mais constitue aussi un facteur angiogénique principal via son rôle de chémoattraction des EPCs. L'expression de l'IL-8 est principalement régulée par AP-1 et NF- κ B bien que des séquences consensus de réponses aux hormones (comme ARE, androgen response element) et de NF-IL6 aient également été retrouvées dans son promoteur. De plus, comme expliqué précédemment, les voies de signalisation déclenchées par la liaison à ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont nombreuses et conduisent à l'activation de divers facteurs de transcription dont notamment NF- κ B, AP-1 et STAT3, ce qui souligne l'importance de cette chémokine dans la progression maligne du cancer (Annexe 2). Dès lors, l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 déjà constatée à 6h+0hR pourrait entraîner une augmentation de la transcription d'autres gènes seulement observée à 6h+4hR. En plus de réguler la transcription des gènes, l'IL-8 peut également induire des changements rapides dans l'expression protéique en régulant la fonction de protéines associées à la traduction. En effet, cette cytokine entraîne la phosphorylation multiple de la kinase ribosomiale S6 (rS6K) via l'action concertée de mTOR,

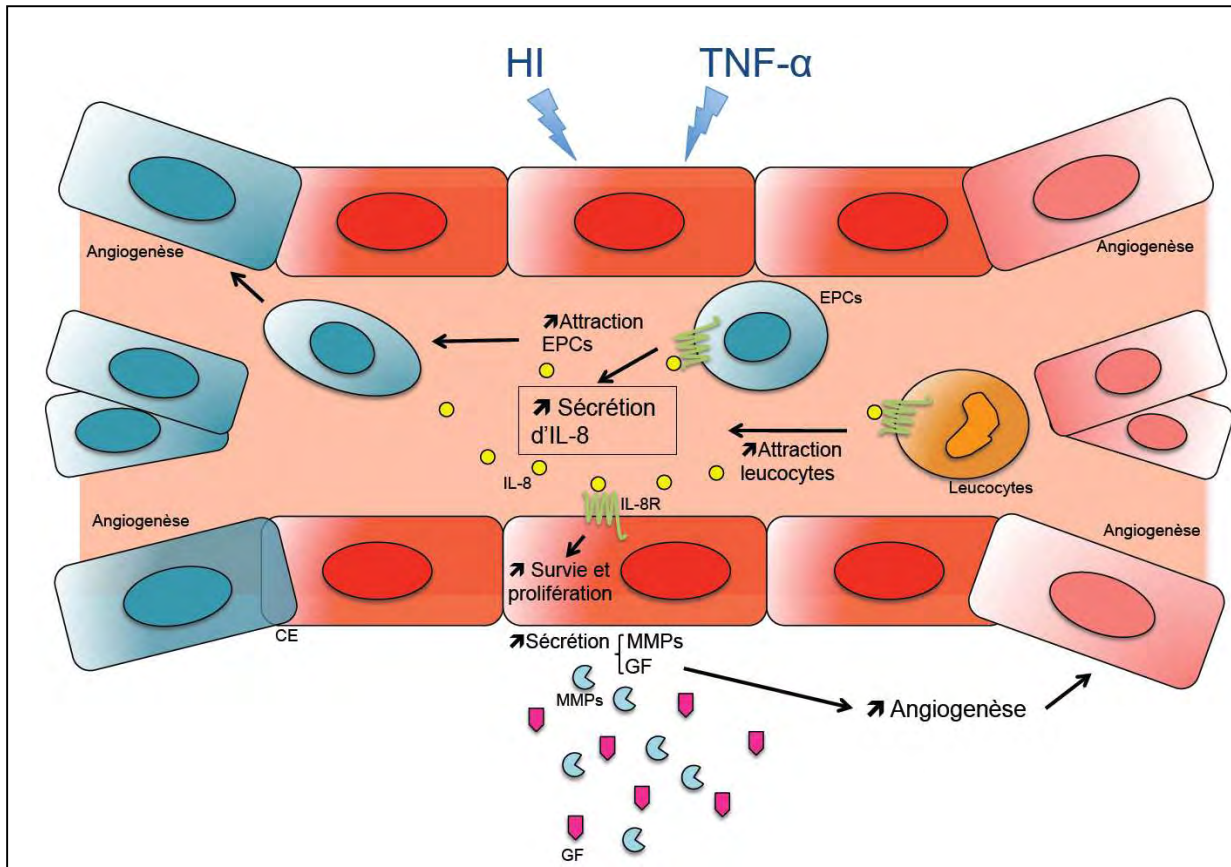


Figure IV.3 : Représentation des conséquences possibles de l'effet combiné de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur la sécrétion d'IL-8 par les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales exposées à une hypoxie intermittente et au TNF- α sécrètent davantage d'IL-8. L'IL-8 est une cytokine chémoattractrice pour les progéniteurs endothéliaux (EPCs) et les leucocytes. Elle induit aussi la survie et la prolifération cellulaire et induit la sécrétion de MMPs et de facteurs de croissance. Ainsi, l'attraction des leucocytes promeut l'inflammation au site tumoral tandis que l'attraction des EPCs et la prolifération des cellules endothéliales et leur sécrétion de MMPs favorisent l'angiogenèse. En conclusion, les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique lorsqu'elles sont soumises à une hypoxie intermittente combinée à un environnement inflammatoire.

CE : cellule endothéliale ; EPCs : progéniteurs endothéliaux ; GF : facteur de croissance ; HI : hypoxie intermittente ; IL-8R : récepteur de l'IL-8

ERK et PKC (Waugh and Wilson, 2008). Ainsi, par l'induction de toutes ces voies de signalisation, l'IL-8 favorise la réponse angiogénique en induisant la prolifération, la survie, la migration des cellules endothéliales et constitue un exemple parfait de la relation proche entre l'inflammation et l'angiogénèse, à l'instar de l'IL-6. Son activité pro-angiogénique a été confirmée *in vivo* via l'ajout journalier de 3 pM d'IL-8 stimulant l'angiogénèse chez les rats et *in vitro* via le traitement de cellules endothéliales avec de l'IL-8 recombinante conduisant à la formation de structures tubulaires et à leur migration (Hu et al., 1993; Li et al., 2003). Inversement, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IL-8 bloque la néovascularisation induite par le TNF- α dans la cornée de lapin *in vivo* ainsi que l'association de cellules endothéliales en structures tubulaires induite par le TNF- α *in vitro* (Yoshida et al., 1997). Ces effets pourraient être expliqués par une augmentation significative des niveaux d'ARNm de MMP-2 et de MMP-9 ainsi que de leur activité enzymatique mesurée par zymographie (Li et al., 2003). Toutefois, dans notre étude, l'abondance de ces transcrits ne semble pas corrélérer avec la sécrétion d'IL-8 augmentée en HI en présence de TNF- α . D'un point de vue physiopathologique, un niveau élevé d'IL-8 dans le sérum est utilisé comme marqueur du cancer et est associé à un mauvais pronostic de guérison (Muramatsu and Muramatsu, 2008). Le rôle angiogénique de l'IL-8 n'est donc plus à démontrer. Par conséquent, sa sécrétion augmentée en HI en présence de TNF- α confirme les effets associés de ces deux facteurs sur l'induction d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique par les cellules endothéliales (Figure IV.3). Pour la suite de l'investigation de l'impact de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8, nous pourrions utiliser, comme Yoshida et al., des anticorps neutralisants de l'IL-8 lors de scratch assay. Néanmoins, la sécrétion d'IL-8 augmentée en HI dépend de la présence du TNF- α tandis que nous avons montré que la migration des cellules endothéliales n'est que très légèrement influencée par le TNF- α et est surtout augmentée suite à l'HI indépendamment de la présence de TNF- α à 6h+0hR. En plus de l'impact sur la migration des cellules endothéliales, nous pourrions évaluer l'effet de l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 sur la chimiotaxie des leucocytes à l'aide d'une chambre de Boyden et en utilisant des milieux conditionnés contenant ou non des anticorps neutralisants anti-IL-8. Toutes ces perspectives peuvent également s'appliquer à l'étude des effets de l'augmentation de la sécrétion d'IL-6.

Ensuite, le **bFGF**, dernier des quatre gènes montrant des variations d'expression en ARNm intéressantes, avec une augmentation en HI indépendamment du TNF- α à 6h+4hR, a été étudié au niveau protéique afin de continuer la caractérisation du phénotype « purement » pro-angiogénique des cellules endothéliales. Nous avons d'abord mesuré la sécrétion de ce facteur de croissance qui a montré une nette augmentation en HI en présence de TNF- α à 6h+16hR. Comme pour l'IL-6, l'expression génique du bFGF n'est pas induite par le TNF- α , par contre sa sécrétion l'est fortement en HI mais pas dans les autres conditions. Ceci suggère donc un effet conjugué et interdépendant de l'HI et du TNF- α sur la sécrétion du bFGF à 6h+16hR. Ces résultats sont donc intéressants au vu du rôle du bFGF dans l'angiogénèse via ses effets sur la prolifération des cellules endothéliales, de leur migration et de leur production de protéases. Pour illustrer son rôle angiogénique, Li et al. ont d'ailleurs montré qu'un traitement de cellules endothéliales avec du bFGF augmente la formation de structures tubulaires (Li et al., 2003). On en déduit que sa sécrétion augmentée en HI en présence de TNF- α à 6h+16hR pourrait favoriser l'angiogénèse.

Ultérieurement, la mesure de l'abondance intracellulaire du bFGF a mis en évidence la présence de six isoformes dont aucune ne varie en fonction de la présence ou de l'absence de TNF- α ou en fonction de la N, HC et HI à 6h+16hR. Ces six isoformes possèdent des séquences NLS au sein de leur séquence en acides aminés permettant leur translocation

nucléaire. Nous avons donc décidé d'étudier la localisation subcellulaire du bFGF afin de vérifier et quantifier une possible localisation nucléaire pouvant varier indépendamment de l'abondance protéique. Grâce au marquage en immunofluorescence, nous avons tout d'abord observé une augmentation de l'abondance du bFGF en HI par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR (que nous n'avons pas pu observer en western blot car il n'a été réalisé que pour le temps 6h+16hR). Nous avons également constaté une localisation nucléaire plus importante en HI par rapport à la N et l'HC et de plus en plus marquée au cours de la réoxygénation. De plus, le marquage du bFGF montre une organisation en un réseau étendu dans toute la cellule à 6h+0hR et devenant périnucléaire à 6h+16hR en N et plus faiblement en HC tandis qu'il reste bien dispersé en HI. Ce réseau faisant penser au réseau mitochondrial, un co-marquage du bFGF et des mitochondries a alors été réalisé. Dans toutes les conditions, une co-localisation des deux marquages est observée avec un réseau mitochondrial fortement périnucléaire en N et en HC à 6h+16hR au contraire de l'HI préservant ce réseau. Cette disposition du réseau mitochondrial explique donc la disposition du marquage du bFGF, devenant surtout périnucléaire en N à 6h+16hR. Néanmoins, le bFGF ne se localise pas que dans le noyau et les mitochondries. Il pourrait donc se retrouver dans d'autres organites. Pour ce faire, nous avons testé sa co-localisation avec les lysosomes. Aucune co-localisation n'a été identifiée mais ce marquage doit être recommencé vu le faible nombre de cellules dont les lysosomes ont été marqués. Néanmoins, Yu et al. ont déjà montré une absence d'immunoréactivité vis-à-vis du bFGF dans les lysosomes, le RE et le Golgi joignant nos résultats (Yu et al., 1993). Le mécanisme responsable de la sécrétion du bFGF n'est en réalité pas encore bien défini mais il est établi que le bFGF est sécrété par un mécanisme indépendant de la voie sécrétoire classique impliquant le RE et le Golgi (Ornitz and Itoh, 2001; Powers et al., 2000). En effet, Mignatti et al., en utilisant des drogues interférant avec la sécrétion passant la voie RE-Golgi ou avec les protéines MDR (multidrug resistance), ont observé que la sécrétion du bFGF n'était pas altérée (Mignatti et al., 1992). Il a ensuite été montré que le bFGF pourrait être relargué via un mécanisme dépendant de l'énergie. Florkiewicz et al. ont montré qu'en utilisant des cardénolides dont la seule cible connue est la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase, le transport du bFGF était altéré. Ils en ont alors suggéré un rôle de la sous-unité α de la Na^+/K^+ ATPase dans l'export du bFGF (Florkiewicz et al., 1998). Suite à ces résultats, Dahl et al. ont montré que l'ouabaïne, inhibiteur spécifique de la Na^+/K^+ ATPase inhibe la sécrétion du bFGF (Dahl et al., 2000). Taverna et al. ont montré que la voie de sécrétion du bFGF consiste en la libération de vésicules membranaires contenant ce facteur par un mécanisme de bourgeonnement. Ces vésicules membranaires sont différentes des exosomes ; ces dernières étant des vésicules plus petites pouvant elles aussi véhiculer des protéines sécrétées mais faisant partie du système endosomal (catégorie des endosomes tardifs/lysosomes) (Taverna et al., 2003). En conclusion, la sécrétion du bFGF requiert un mécanisme indépendant de la voie RE-Golgi et ne fait pas intervenir le système endosomal.

De plus, le bFGF induit un large spectre de résistance aux agents chimiothérapeutiques en inhibant l'apoptose dans de nombreux types tumoraux. Xiao et al. ont d'ailleurs montré qu'une exposition de cellules cancéreuses humaines de poumon (H446) au bFGF réduit l'apoptose venant de la déprivation en sérum par l'inhibition de l'activité de la caspase-3, l'augmentation de l'expression de la survivine (une protéine IAP), et l'inhibition du relargage de Smac de la mitochondrie dans le cytoplasme (inhibant les IAPs) (Xiao et al., 2008). Alavi et al. ont aussi observé que le bFGF protège les cellules endothéliales (HUVEC) du stress induit par des drogues anti-cancéreuses telles que la doxorubicine en stimulant la formation d'un complexe Raf-1/ASK1 dans la mitochondrie empêchant ainsi l'activité de la kinase ASK1 nécessaire à l'apoptose des cellules endothéliales (Alavi et al., 2007). Ces effets du bFGF pourraient venir de l'isoforme ou des isoformes présentes dans la mitochondrie.

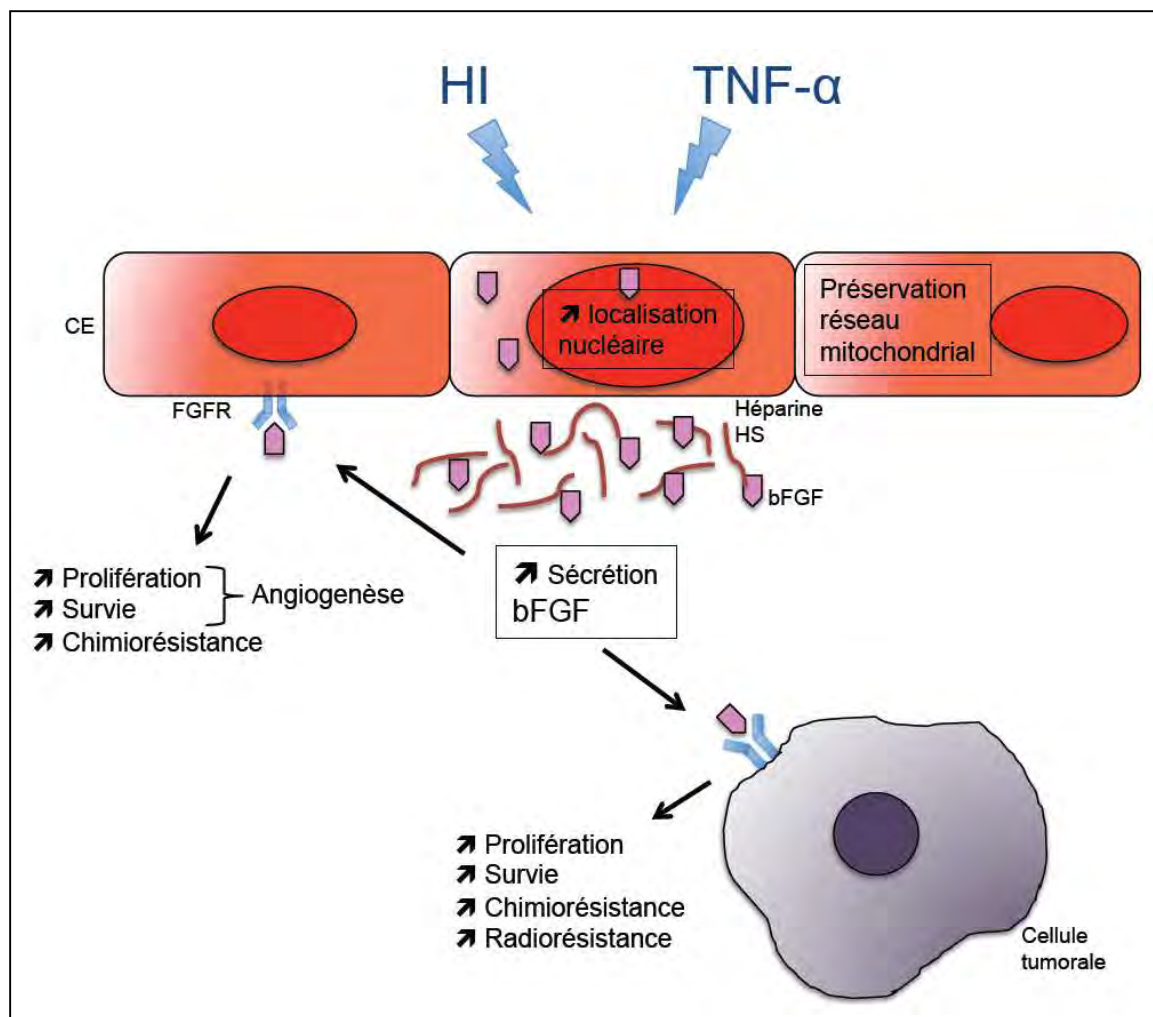


Figure IV.4 : Représentation des conséquences possibles de l'effet de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur l'expression protéique du bFGF par les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales exposées à une hypoxie intermittente et au TNF- α sécrètent davantage de bFGF. L'HI entraîne aussi une augmentation de la localisation nucléaire du bFGF ainsi qu'une préservation du réseau mitochondrial. Le bFGF entraîne une augmentation de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales et des cellules tumorales et donc respectivement une augmentation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. De plus, le bFGF conduit à une chimiorésistance des cellules endothéliales et tumorales, et une radiorésistance des cellules tumorales. En conclusion, par l'augmentation de la sécrétion de bFGF, les cellules endothéliales présentent un phénotype pro-angiogénique et facilitent la progression tumorale.

CE : cellule endothéliale ; FGFR : récepteur des FGF ; HI : hypoxie intermittente ; HS : héparan sulfate

En plus d'induire une chimiorésistance des cellules tumorales et endothéliales, Ader et al. ont mis en évidence un effet radioprotecteur de l'isoforme 24 kDa du bFGF dans des cellules HeLa. En effet, ils ont montré que les cellules surexprimant l'isoforme 24 kDa présentent une activité double de l'holoenzyme DNA-PK nécessaire à la réparation des cassures doubles brins induites par les radiations ionisantes. Cette augmentation d'activité est en fait due à une augmentation de la transcription du gène DNA-PK induite par l'isoforme 24kDa du bFGF (Ader et al., 2002).

Par ailleurs, l'expression du bFGF est régulée post-transcriptionnellement par un ARNm anti-sens transcrit à partir du gène GFG du brin d'ADN opposé (Zhang et al., 2008). Le transcrit FGF-AS (FGF antisens) a été identifié pour la première fois chez *Xenopus laevis* et par la suite dans d'autres vertébrés dont l'homme (Gagnon et al., 1999; Kimelman and Kirschner, 1989; Knee et al., 1994). L'ARNm de GFG est impliqué dans la régulation de l'expression génique du bFGF tandis que l'expression et la fonction de la protéine GFG, présente également sous plusieurs isoformes (trois chez l'homme et le rat) comme le bFGF, sont le sujet de plusieurs études. Ainsi, Zhang et al. ont identifié la présence d'une séquence MTS (mitochondrial targeting sequence) dans le côté N-terminal de trois isoformes de GFG chez le rat. Ils ont étudié la localisation de ces trois isoformes via l'utilisation de la microscopie confocale et ont observé un ciblage spécifique de ces isoformes dans les mitochondries. Ils ont également montré que des mutants ne possédant plus la séquence MTS sont uniquement localisés dans le noyau et le cytoplasme mais pas dans les mitochondries. La séquence MTS est donc nécessaire et suffisante à la compartimentalisation mitochondriale (Zhang et al., 2008). Chez l'homme, une des trois isoformes du GFG contient également une séquence MTS permettant son ciblage dans les mitochondries (Zhang et al., 2007). Par contre, nous n'avons rien trouvé sur l'éventuelle localisation d'une isoforme du bFGF dans la mitochondrie ni la présence d'une séquence MTS dans la séquence en acides aminés d'une isoforme du bFGF. Toutefois, la localisation très partielle du bFGF dans les mitochondries suggère que toutes les isoformes ne possèdent pas de séquences MTS et qu'une isoforme seule pourrait se localiser dans les mitochondries. Afin de confirmer ces propos, une analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés selon la même méthode que celle développée par Zhang et al. pourrait permettre de trouver la présence d'une séquence MTS dans une ou plusieurs isoformes du bFGF.

En conclusion, nous avons montré une augmentation de la sécrétion du bFGF en HI en présence de TNF- α à 6h+16hR, une augmentation de sa localisation nucléaire en HI indépendamment du TNF- α ainsi que la préservation du réseau mitochondrial dans lequel est localisé au moins une isoforme du bFGF (Figure IV.4).

Concernant les perspectives envisagées pour continuer l'étude de ce facteur de croissance, d'autres co-marquages pourraient être investigués comme celui du bFGF avec celui de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique pour confirmer le mécanisme de sécrétion indépendant de la voie sécrétoire classique. Un co-marquage du bFGF et des peroxysomes (marqués pour la catalase) pourrait aussi être réalisé. De plus, pour vérifier l'augmentation de la localisation nucléaire du bFGF ainsi qu'une localisation mitochondriale, un fractionnement subcellulaire pourrait être effectué. Cette technique permettrait de séparer par centrifugation différentielle les fractions N, M, L et PS qui correspondent respectivement aux noyaux, mitochondries, lysosomes, et le reste du cytoplasme. Grâce à cette méthode, l'abondance du bFGF dans ces différents compartiments pourra être étudiée de manière plus quantitative en fonction des différentes conditions d'incubation des cellules. Le fractionnement subcellulaire apportera également une information sur la localisation des différentes isoformes séparées

Tableau IV.1 : Membres de la famille des MMPs (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005).

Subgroup	MMP	Name	Substrate
1. Collagenases	MMP-1	Collagenase-1	Col I, II, III, VII, VIII, X, gelatin
	MMP-8	Collagenase-2	Col I, II, III, VII, VIII, X, aggrecan, gelatin
	MMP-13	Collagenase-3	Col I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatin
2. Gelatinases	MMP-2	Gelatinase A	Gelatin, Col I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatin, Col IV, V
3. Stromelysins	MMP-3	Stromelysin-1	Col II, IV, IX, X, XI, gelatin
	MMP-10	Stromelysin-2	Col IV, laminin, fibronectin, elastin
	MMP-11	Stromelysin-3	Col IV, fibronectin, laminin, aggrecan
4. Matrilysins	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin, laminin, Col IV, gelatin
	MMP-26	Matrilysin-2	Fibrinogen, fibronectin, gelatin
5. MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-15	MT2-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-16	MT3-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-17	MT4-MMP	Fibrinogen, fibrin
	MMP-24	MT5-MMP	Gelatin, fibronectin, laminin
	MMP-25	MT6-MMP	Gelatin
6. Others	MMP-12	Macrophage metalloelastase	Elastin, fibronectin, Col IV
	MMP-19		Aggrecan, elastin, fibrillin, Col IV, gelatin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrecan
	MMP-21	XMMP	Aggrecan
	MMP-23		Gelatin, casein, fibronectin
	MMP-27	CMMP	Unknown
	MMP-28	Epilysin	Unknown

MMPs are categorized according to the organization of their peptide domains, their substrate specificity, and their sequence similarity (8,12,17,22–24,85–87). MMP, matrix metalloproteinase; MT-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase.

(que ne peut pas nous donner le marquage en immunofluorescence) et permettra d'évaluer le nombre d'isoformes présentes dans la mitochondrie, complétant les recherches d'éventuelles séquences MTS *in silico*. Le rôle des mitochondries et la préservation du réseau mitochondrial dans la signalisation et la fonction du bFGF devront également être investigués. Il se pourrait que la présence mitochondriale du bFGF intervienne dans la protection des cellules contre l'apoptose et donc dans leur chimiorésistance. D'autre part, pour mesurer l'impact des formes nucléaires sur la migration des cellules endothéliales, des siRNA bFGF pourraient être utilisés. L'avantage de cette technique par rapport à des anticorps neutralisants est qu'elle permet de cibler directement les ARNm et ainsi toutes les formes de bFGF et pas uniquement la forme sécrétée. Etant donné que la migration des cellules endothéliales augmente déjà à 6h+0hR en HI alors que la sécrétion de bFGF n'est augmentée qu'à 6h+16hR et qu'en présence de TNF- α , le ciblage des formes nucléaires semble le plus prometteur puisqu'on observe déjà une translocation nucléaire en HI à 6h+0hR en présence ou non de TNF- α ; ce qui correspond donc mieux à l'effet migratoire. Ces siRNA, en vérifiant leur efficacité en western blot, pourraient être utilisés avant d'effectuer un test de migration ou encore un test sur Matrigel qui évalue la capacité des cellules endothéliales à s'associer en structures tubulaires. En effet, en plus de montrer un effet migratoire de l'HI seule sur les cellules endothéliales après 5h30 d'incubation, Toffoli et al. ont également montré que l'HI augmente fortement la formation de structures tubulaires par les cellules endothéliales par rapport à la N (Toffoli et al., 2009). Nous pourrions donc également utiliser ce test.

Une seconde grande approche a été poursuivie dans ce travail, à savoir l'étude de l'activité de **protéases** capables de digérer la gélatine et présentes dans le milieu des cellules EAhy926 en zymographie. Nous avons montré que l'activité d'une protéase ou d'un ensemble de protéases en interaction se trouvant aux alentours de 70 kDa est significativement augmentée en HI en absence de TNF- α à 6h+16hR. Cette enzyme présente également une activité fortement augmentée par le TNF- α . Nous n'avons toujours pas réussi à identifier la ou les protéine(s) responsable(s) de cette bande de dégradation. Néanmoins, nous pouvons affirmer que la bande n'est pas due à l'activité des formes précurseurs ou des formes actives de la MMP-2, de la MMP-9, de la MMP-8 ou de la MMP-13 mais que la ou les enzyme(s) nécessite(nt) du calcium pour être active(s). En effet, la seule fois où la bande de dégradation à environ 70 kDa n'est pas apparue sur le zymogramme vient de l'ajout d'EDTA dans le tampon d'activation suggérant que l'enzyme est une métalloprotéinase. L'essai d'identification par la spectrométrie de masse a échoué car aucune protéine capable de dégrader la MEC n'a été identifiée. Cet échec est probablement dû à la quantité très faible de ces protéases. Or, l'identification de cette supposée MMP serait intéressante puisque ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des protéines de la MEC constituant une étape clé de l'angiogenèse. Ainsi, la dérégulation de la balance entre les MMPs et leurs inhibiteurs (TIMPs) est une caractéristique de nombreuses pathologies dont le cancer. Des niveaux élevés de MMPs corrélerent avec l'invasion et le faible pronostic. La famille des MMPs humaines est constituée de 23 formes différentes divisées en six groupes (Tableau IV.1) (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005). Dans ce tableau, sont également répertoriées les MMPs capables de digérer la gélatine. Nous constatons que les gélatinases et collagénases sont loin d'être les seules. Nous pourrions donc nous baser sur ce tableau pour continuer l'investigation de l'enzyme responsable de cette bande de dégradation. Avant d'utiliser d'autres inhibiteurs, l'expression génique pourrait être mesurée en RT-PCR quantitative afin de s'assurer d'une part, que ce gène soit exprimé par les cellules EAhy926 (par exemple, la MMP-3, capable de digérer la gélatine, n'est pas exprimée dans ces cellules) et afin de voir d'autre part, si un des profils d'expression en ARNm ne pourrait pas correspondre au profil d'activité de l'enzyme,

ce qui permettrait ainsi une première sélection. Ensuite, si certaines MMPs présentent des profils d'expression en ARNm intéressants, en fonction de leur classe, le substrat du zymogramme pourrait être adapté. La gélatine serait ainsi remplacée par exemple par de la caséine permettant de détecter l'activité de la MMP-11, -7, -1, -12 et -13 (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005). Cependant, si nous devons opter pour un nouveau candidat il s'agirait probablement de la MMP-19. En effet, comme noté dans le tableau, cette MMP est capable de dégrader la gélatine. De plus, Hagemann et al. ont montré que deux des MMPs qu'ils ont étudiées ont une expression en ARNm augmentée par le TNF- α , à savoir la MMP-9 et la MMP-19, dans des cellules de glioblastomes humains U251 et U373 (Hagemann et al., 2010).

Par ailleurs, la spectrométrie de masse nous a informé sur la sécrétion possible de la **pentraxine 3** (PTX3) par les cellules EAhy926. Nous avons alors testé l'expression en ARNm de PTX3 et nous avons montré que son expression génique est augmentée en HI seule par rapport à la N et l'HC, qu'elle est augmentée par le TNF- α , et que l'HI augmente davantage l'effet induit par le TNF- α par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR. Cette augmentation de l'expression génique de PTX3 en HI seule et en HI avec TNF- α à 6h+0hR est très intéressante étant donné les rôles que joue cette protéine. La PTX3, connue précédemment sous les noms de TNFAIP5 (tumor necrosis factor-alpha-induced protein 5) ou de TSG-14 (tumor necrosis factor-stimulated gene 4), est une glycoprotéine sécrétée appartenant à la famille des pentraxines longues incluant aussi la CRP (C-reactive protein) et le composant SAP (serum amyloid P) (Osmand et al., 1977). PTX3 a tout d'abord été décrit comme un gène inductible par le TNF- α dans des fibroblastes humains. Peu de temps plus tard, ce gène a été décrit pour être rapidement induit par l'IL-1 β dans les cellules endothéliales (Alles et al., 1994; Breviario et al., 1992). L'expression génique de PTX3 a été montrée pour être largement dépendante de l'activation de NF- κ B dans des cellules EAhy926. De plus, la PTX3 a été montrée pour posséder une activité chimotactique sur les monocytes THP-1 humains. En effet, en utilisant une chambre de Boyden, Gustin et al. ont démontré que la PTX3 recombinante humaine est capable d'induire une chimotaxie des monocytes humains THP-1 de façon dépendante de sa concentration (Gustin et al., 2008). Une surexpression en ARNm et en protéines de PTX3 a également été retrouvée dans des liposarcomes humains (Willeke et al., 2006). En plus de ces rôles pro-inflammatoires, la PTX3 semble démontrer un rôle anti-angiogénique en se liant avec une haute affinité au bFGF, empêchant alors la liaison de ce facteur à son récepteur et jouant ainsi le rôle d'inhibiteur endogène (Rusnati et al., 2004). En conclusion, les rôles de PTX3 ne sont pas encore bien définis et sont caractérisés d'une part comme pro-inflammatoires et d'autre part comme anti-angiogéniques. Un ELISA spécifique pour PTX3 pourra être effectué pour étudier la sécrétion de cette protéine dans le milieu d'incubation et ainsi voir si elle augmente en HI seule et encore plus en HI en présence de TNF- α . De plus, si sa sécrétion est effectivement augmentée, les milieux conditionnés de cellules endothéliales stimulées en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α pourraient être utilisés pour étudier leur influence chimotactique sur des monocytes humains THP-1 en utilisant une chambre de Boyden. Des siRNA PTX3 pourraient également être utilisés afin de réduire la sécrétion de PTX3 et la capacité chimotactique des milieux d'incubation envers des monocytes pourrait ensuite être testée. Le rôle de la PTX3 vis-à-vis du bFGF devra aussi être investigué.

La dernière approche de ce travail consiste en l'étude fonctionnelle des effets de l'HI et du TNF- α sur la **migration** des cellules endothéliales. Comme déjà cité auparavant, nous avons montré que l'HI augmente fortement leur migration par rapport à la N et l'HC à 6h+0hR tandis que le TNF- α ne l'influence que très peu. Aucun des résultats montrés dans ce

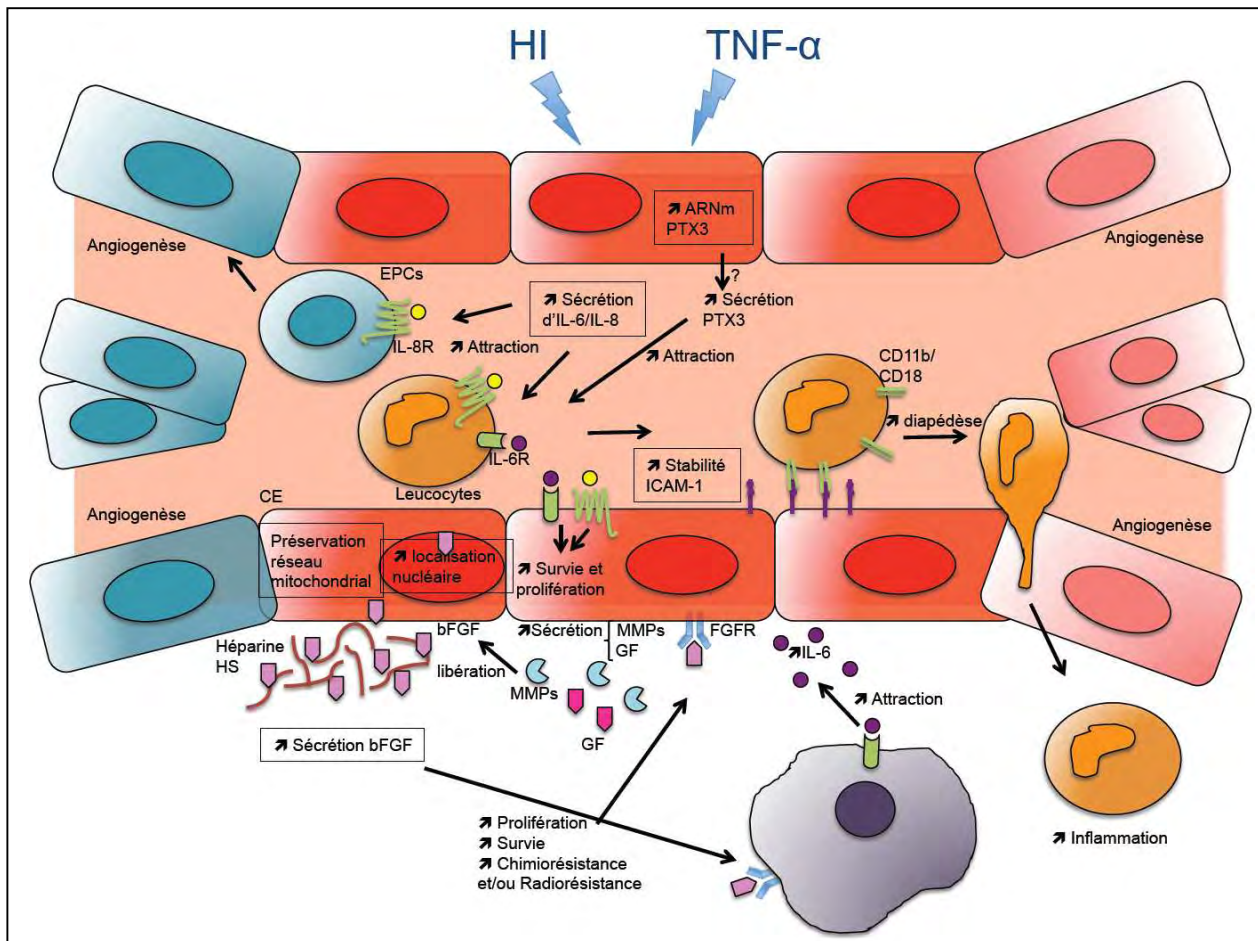


Figure IV.5 : Représentation des conséquences possibles des effets de l'hypoxie intermittente et du TNF- α sur le phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales exposées à une hypoxie intermittente et au TNF- α présentent une augmentation de la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF ainsi qu'une augmentation de la stabilité de l'expression protéique de ICAM-1. L'hypoxie intermittente augmente aussi la translocation nucléaire partielle du bFGF et protège le réseau mitochondrial. La sécrétion augmentée d'IL-6 et d'IL-8 conduit au recrutement de leucocytes, qui adhèrent ensuite fermement aux cellules endothéliales exprimant ICAM-1, augmentant alors l'inflammation présente au site tumoral. L'IL-8 entraîne également le recrutement d'EPCs favorisant l'angiogenèse tandis que l'IL-6 attire les cellules tumorales favorisant ainsi leur dissémination. La liaison de l'IL-6 et de l'IL-8 à leur récepteur respectif favorise la survie et la prolifération des cellules endothéliales et leur sécrétion de MMPs et de facteurs de croissance, augmentant l'angiogenèse. De plus, la sécrétion des MMPs permet le relargage de facteurs de croissance dont notamment le bFGF lié à l'héparine ou l'héparan sulfate et augmente ainsi leur disponibilité. En outre, le bFGF peut aller se lier à son récepteur présent à la surface des cellules endothéliales et des cellules tumorales et favorise leur survie, prolifération, chimiorésistance et/ou radiorésistance. L'HI et le TNF- α entraînent aussi l'augmentation de l'expression en ARNm de PTX3 par les cellules endothéliales, qui pourrait éventuellement conduire à une augmentation de sa sécrétion et dès lors favoriser le recrutement de leucocytes.

CE : cellule endothéliale ; EPCs : progéniteurs endothéliaux ; FGFR : récepteur au FGF ; GF : facteur de croissance ; HI : hypoxie intermittente ; HS : héparan sulfate ; IL-6R : récepteur de l'IL-6 ; IL-8R : récepteur de l'IL-8

mémoire ne semble *a priori* pouvoir expliquer cet effet précoce de l'HI indépendamment du TNF- α sur la migration cellulaire. En effet, l'augmentation des sécrétions d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF est dépendante de la présence de TNF- α et l'activité de la protéase d'intérêt est fortement stimulée par le TNF- α . Seule la localisation nucléaire du bFGF augmentée en HI indépendamment du TNF- α à 6h+0hR serait susceptible d'expliquer ce résultat. Cet effet sur la migration est donc certainement expliqué par la présence et les rôles combinés d'autres molécules, que nous n'avons jusqu'ici pas encore eu l'occasion d'étudier. Afin de réaliser une étude plus large des niveaux de sécrétion de plusieurs molécules simultanément, nous pourrions utiliser plusieurs « arrays » de cytokines. En effet, il existe des plate-formes permettant la mesure quantitative de l'abondance de nombreuses cytokines simultanément (jusqu'à 40 cytokines chez Gentel Biosciences, 36 cytokines chez R&D Systems, et 7 cytokines chez BD Biosciences).

2) Conclusion générale

En conclusion, nous avons montré au fil de ces expériences les effets de l'HI en combinaison ou non avec le TNF- α sur la mise en place d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-angiogénique des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales exposées à ces conditions d'hypoxie intermittente et d'inflammation présentent une expression de la glycoprotéine ICAM-1 stable et élevée pendant plusieurs heures ainsi qu'un sécrétome caractérisé par des niveaux d'IL-6, d'IL-8 et de bFGF largement augmentés. Pour continuer la caractérisation du sécrétome, la sécrétion de PTX3 pourrait être mesurée étant donné l'augmentation de son expression en ARNm à 6h+0hR en HI seule et encore plus en HI en présence de TNF- α . Les cellules démontrent en plus une augmentation de la localisation nucléaire partielle du bFGF et une protection du réseau mitochondrial (Figure IV.5). Nous avons également montré que les cellules endothéliales sécrètent de la MMP-2 et de la MMP-9 se retrouvant en complexe avec une protéine qui pourrait être la lipocaline mais leur activité n'est pas influencée par la pO₂, ni par la présence de TNF- α . Par contre, une enzyme d'un poids moléculaire apparent de 70 kDa montre une activité augmentée par l'HI seule. Ainsi, au travers des modifications transcriptomiques et protéomiques, l'HI associée à un environnement inflammatoire induit l'initiation d'un programme pro-inflammatoire et pro-angiogénique modifiant le phénotype des cellules endothéliales.

Dans le but de confirmer ces résultats sur un modèle d'étude encore plus physiologique, l'inflammation pourrait être « mimée » de façon plus intégriste. En l'occurrence, des macrophages présentant un phénotype M2, faisant référence aux TAMs retrouvés au site tumoral, pourraient être stimulés par du TNF- α et incubés en HI. Leur milieu d'incubation pourrait ensuite être récolté et être utilisé comme milieu d'incubation des cellules endothéliales afin d'imiter au mieux l'environnement tumoral dans lequel se retrouvent ces cellules. En plus de mimer une inflammation plus complexe, ce modèle d'étude permettrait aussi d'apprécier l'ensemble des effets de l'HI sur les TAMs.

Avant de clôturer définitivement ce mémoire, je voudrais souligner que ce sujet regorge encore de « mille et une choses » à découvrir. Les résultats obtenus ont dévoilé de multiples pistes de recherche passionnantes à explorer, leur but idéal étant de mener au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'homme face à la malignité du cancer est encore impuissant. Or, n'être qu'un pion de la recherche sur le cancer fournit la gratitude que l'ensemble de chaque pion construit l'édifice.

- Ader I, Muller C, Bonnet J, Favre G, Cohen-Jonathan E, Salles B, Toulas C (2002) The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene* 21:6471-6479
- Ahn K, Pan S, Beningo K, Hupe D (1995) A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells. *Life sciences* 56:2331-2341
- Alavi AS, Acevedo L, Min W, Cheres DA (2007) Chemoresistance of endothelial cells induced by basic fibroblast growth factor depends on Raf-1-mediated inhibition of the proapoptotic kinase, ASK1. *Cancer research* 67:2766-2772
- Albini A, Sporn MB (2007) The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nature reviews* 7:139-147
- Allavena P, Garlanda C, Borrello MG, Sica A, Mantovani A (2008a) Pathways connecting inflammation and cancer. *Current opinion in genetics & development* 18:3-10
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008b) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical reviews in oncology/hematology* 66:1-9
- Alles VV, Bottazzi B, Peri G, Golay J, Introna M, Mantovani A (1994) Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes. *Blood* 84:3483-3493
- Badache A, Hynes NE (2001) Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer research* 61:383-391
- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nature reviews* 4:540-550
- Balkwill F (2006) TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer metastasis reviews* 25:409-416
- Balkwill F (2009) Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews* 9:361-371
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545
- Bauer J, Margolis M, Schreiner C, Edgell CJ, Azizkhan J, Lazarowski E, Juliano RL (1992) In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *Journal of cellular physiology* 153:437-449
- Beissert S, Bergholz M, Waase I, Lepsien G, Schauer A, Pfizenmaier K, Kronke M (1989) Regulation of tumor necrosis factor gene expression in colorectal adenocarcinoma: in vivo analysis by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:5064-5068
- Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A (2002) Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circulation research* 90:784-791
- Bennewith KL, Durand RE (2004) Quantifying transient hypoxia in human tumor xenografts by flow cytometry. *Cancer research* 64:6183-6189
- Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, Fazio MR, Bono C, Coppolino G, Buemi M (2010) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer letters* 288:10-16
- Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:6770-6774

- Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, Saccone S, Marzella R, Predazzi V, Rocchi M, et al. (1992) Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *The Journal of biological chemistry* 267:22190-22197
- Brown JM, Giaccia AJ (1998) The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer research* 58:1408-1416
- Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP (2001) Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors. *Cancer research* 61:8903-8908
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* 6:389-395
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-257
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72:3666-3670
- Chaplin DJ, Hill SA (1995) Temporal heterogeneity in microregional erythrocyte flux in experimental solid tumours. *British journal of cancer* 71:1210-1213
- Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT (1995) Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27:1281-1292
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867
- Dahl JP, Binda A, Canfield VA, Levenson R (2000) Participation of Na,K-ATPase in FGF-2 secretion: rescue of ouabain-inhibitable FGF-2 secretion by ouabain-resistant Na,K-ATPase alpha subunits. *Biochemistry* 39:14877-14883
- Dewhirst MW (2007) Intermittent hypoxia furthers the rationale for hypoxia-inducible factor-1 targeting. *Cancer research* 67:854-855
- Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews* 8:425-437
- Dubrave DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML (1990) Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:6758-6761
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine* 315:1650-1659
- Edgell CJ, Haizlip JE, Bagnell CR, Packenham JP, Harrison P, Wilbourn B, Madden VJ (1990) Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA.hy926. *In Vitro Cell Dev Biol* 26:1167-1172
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:3734-3737
- Elder DJ, Halton DE, Hague A, Paraskeva C (1997) Induction of apoptotic cell death in human colorectal carcinoma cell lines by a cyclooxygenase-2 (COX-2)-selective nonsteroidal anti-inflammatory drug: independence from COX-2 protein expression. *Clin Cancer Res* 3:1679-1683
- Elkin M, Ilan N, Ishai-Michaeli R, Friedmann Y, Papo O, Pecker I, Vlodavsky I (2001) Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action. *Faseb J* 15:1661-1663
- Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z, Koller CA, Kurzrock R, Thomas DA, Faderl S, Lerner S, O'Brien S, Albitar M (2002) The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1215-1219

- Florkiewicz RZ, Anchin J, Baird A (1998) The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase. *The Journal of biological chemistry* 273:544-551
- Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ (2000) Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *The American journal of pathology* 156:361-381
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 285:1182-1186
- Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I (1988) A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *The American journal of pathology* 130:393-400
- Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H (2005) Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vascular health and risk management* 1:277-290
- Gagnon ML, Moy GK, Klagsbrun M (1999) Characterization of the promoter for the human antisense fibroblast growth factor-2 gene; regulation by Ets in Jurkat T cells. *Journal of cellular biochemistry* 72:492-506
- Galban S, Fan J, Martindale JL, Cheadle C, Hoffman B, Woods MP, Temeles G, Brieger J, Decker J, Gorospe M (2003) von Hippel-Lindau protein-mediated repression of tumor necrosis factor alpha translation revealed through use of cDNA arrays. *Molecular and cellular biology* 23:2316-2328
- Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J (2006) NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical pharmacology* 72:1493-1505
- Gorlach A, Bonello S (2008) The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *The Biochemical journal* 412:e17-19
- Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS (2003) Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of clinical periodontology* 30:542-550
- Gupta K, Shukla M, Cowland JB, Malemud CJ, Haqqi TM (2007) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is expressed in osteoarthritis and forms a complex with matrix metalloproteinase 9. *Arthritis and rheumatism* 56:3326-3335
- Gupta MK, Qin RY (2003) Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 9:1144-1155
- Gustin C, Delaive E, Dieu M, Calay D, Raes M (2008) Upregulation of pentraxin-3 in human endothelial cells after lysophosphatidic acid exposure. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28:491-497
- Hagemann C, Anacker J, Haas S, Riesner D, Schomig B, Ernestus RI, Vince GH (2010) Comparative expression pattern of Matrix-Metalloproteinases in human glioblastoma cell-lines and primary cultures. *BMC research notes* 3:293
- Hagemann T, Lawrence T, McNeish I, Charles KA, Kulbe H, Thompson RG, Robinson SC, Balkwill FR (2008) "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *The Journal of experimental medicine* 205:1261-1268
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70
- Hawkes SP, Li H, Taniguchi GT (2001) Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 151:399-410
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine* 3:177-182
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE (2003) Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature reviews* 3:411-421
- Hillen F, Griffioen AW (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer metastasis reviews* 26:489-502

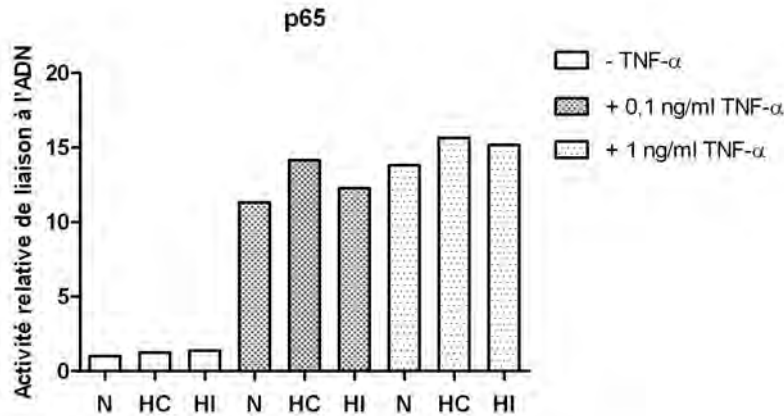
- Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R (2007) Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. *Cancer* 110:1911-1928
- Hong SS, Lee H, Kim KW (2004) HIF-1 α : a valid therapeutic target for tumor therapy. *Cancer Res Treat* 36:343-353
- Hu DE, Hori Y, Fan TP (1993) Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* 17:135-143
- Huang S (2007) Regulation of metastases by signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway: clinical implications. *Clin Cancer Res* 13:1362-1366
- Jain RK, Munn LL, Fukumura D (2002) Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nature reviews* 2:266-276
- Johansson M, Denardo DG, Coussens LM (2008) Polarized immune responses differentially regulate cancer development. *Immunological reviews* 222:145-154
- Kamohara H, Takahashi M, Ishiko T, Ogawa M, Baba H (2007) Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor- α and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *International journal of oncology* 31:627-632
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K (2001) Serum levels of tumor necrosis factor- α and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer research* 21:1355-1358
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature reviews* 2:301-310
- Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology* 70:1469-1480
- Kenneth NS, Rocha S (2008) Regulation of gene expression by hypoxia. *The Biochemical journal* 414:19-29
- Kimelman D, Kirschner MW (1989) An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* 59:687-696
- Kimura H, Braun RD, Ong ET, Hsu R, Secomb TW, Papahadjopoulos D, Hong K, Dewhirst MW (1996) Fluctuations in red cell flux in tumor microvessels can lead to transient hypoxia and reoxygenation in tumor parenchyma. *Cancer research* 56:5522-5528
- Knee RS, Pitcher SE, Murphy PR (1994) Basic fibroblast growth factor sense (FGF) and antisense (gfg) RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and in differentiated adult tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 205:577-583
- Knupfer H, Preiss R (2010) Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients--a summary of published results. *International journal of colorectal disease* 25:135-140
- Lazennec G, Richmond A (2010) Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. *Trends in molecular medicine* 16:133-144
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine* 36:1-12
- Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK (2003) IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170:3369-3376
- Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML (1999) A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant immunology* 7:239-246
- Lorusso G, Ruegg C (2008) The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and cell biology* 130:1091-1103

- Lu ZJ, Ren YQ, Wang GP, Song Q, Li M, Jiang SS, Ning T, Guan YS, Yang JL, Luo F (2009) Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549. *J Exp Clin Cancer Res* 28:16
- Makowski GS, Ramsby ML (2005) Autoactivation profiles of calcium-dependent matrix metalloproteinase-2 and -9 in inflammatory synovial fluid: effect of pyrophosphate and bisphosphonates. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 358:182-191
- Mamytbekova A, Rezabek K, Kacerovska H, Grimova J, Svobodova J (1986) Antimetastatic effect of flurbiprofen and other platelet aggregation inhibitors. *Neoplasma* 33:417-421
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* 155:739-752
- Mantovani A (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature* 457:36-37
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008a) Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444
- Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM (2008b) Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet* 371:771-783
- Martinive P, Defresne F, Bouzin C, Saliez J, Lair F, Gregoire V, Michiels C, Dessy C, Feron O (2006) Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer research* 66:11736-11744
- Matthews CP, Colburn NH, Young MR (2007) AP-1 a target for cancer prevention. *Current cancer drug targets* 7:317-324
- Mbeunkui F, Johann DJ, Jr. (2009) Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 63:571-582
- McDonald DM, Choyke PL (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature medicine* 9:713-725
- Michiels C (2004) Physiological and pathological responses to hypoxia. *The American journal of pathology* 164:1875-1882
- Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Journal of cellular physiology* 151:81-93
- Minet E, Michel G, Mottet D, Raes M, Michiels C (2001) Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free radical biology & medicine* 31:847-855
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D (2005) Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine & growth factor reviews* 16:35-53
- Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW (2004) Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell* 5:429-441
- Mortensen K, Lichtenberg J, Thomsen PD, Larsson LI (2004) Spontaneous fusion between cancer cells and endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61:2125-2131
- Muramatsu T, Muramatsu H (2008) Glycosaminoglycan-binding cytokines as tumor markers. *Proteomics* 8:3350-3359
- Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR (2008) Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology* 164:277-281
- Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR (1993) Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *The Journal of clinical investigation* 91:2194-2206

- Noonan DM, De Lerma Barbaro A, Vannini N, Mortara L, Albini A (2008) Inflammation, inflammatory cells and angiogenesis: decisions and indecisions. *Cancer metastasis reviews* 27:31-40
- Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J (2000) Fibroblast growth factor-2. *The international journal of biochemistry & cell biology* 32:263-267
- Ornitz DM (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22:108-112
- Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2:REVIEWS3005
- Osmand AP, Gerwurz H, Friedenson B (1977) Partial amino-acid sequences of human and rabbit C-reactive proteins: homology with immunoglobulins and histocompatibility antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:1214-1218
- Ostrand-Rosenberg S (2008) Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current opinion in genetics & development* 18:11-18
- Otrock ZK, Hatoum HA, Awada AH, Ishak RS, Shamseddine AI (2009) Hypoxia-inducible factor in cancer angiogenesis: structure, regulation and clinical perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology* 70:93-102
- Pigott KH, Hill SA, Chaplin DJ, Saunders MI (1996) Microregional fluctuations in perfusion within human tumours detected using laser Doppler flowmetry. *Radiother Oncol* 40:45-50
- Polotsky VY, Savransky V, Bevans-Fonti S, Reinke C, Li J, Grigoryev DN, Shimoda LA (2010) Intermittent and Sustained Hypoxia Induce a Similar Gene Expression Profile in the Human Aortic Endothelial Cells. *Physiological genomics*
- Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer* 7:165-197
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB (1991) Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science (New York, NY)* 252:1705-1708
- Richter JD, Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433:477-480
- Robinson SC, Coussens LM (2005) Soluble mediators of inflammation during tumor development. *Advances in cancer research* 93:159-187
- Rocha S (2007) Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends in biochemical sciences* 32:389-397
- Rofstad EK, Gaustad JV, Egeland TA, Mathiesen B, Galappathi K Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *International journal of cancer* 127:1535-1546
- Rollins BJ (2006) Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 42:760-767
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of leukocyte biology* 80:227-236
- Ruegg C (2006) Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *Journal of leukocyte biology* 80:682-684
- Rusnati M, Camozzi M, Moroni E, Bottazzi B, Peri G, Indraccolo S, Amadori A, Mantovani A, Presta M (2004) Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* 104:92-99
- Saccani A, Schioppa T, Porta C, Biswas SK, Nebuloni M, Vago L, Bottazzi B, Colombo MP, Mantovani A, Sica A (2006) p50 nuclear factor-kappaB overexpression in tumor-

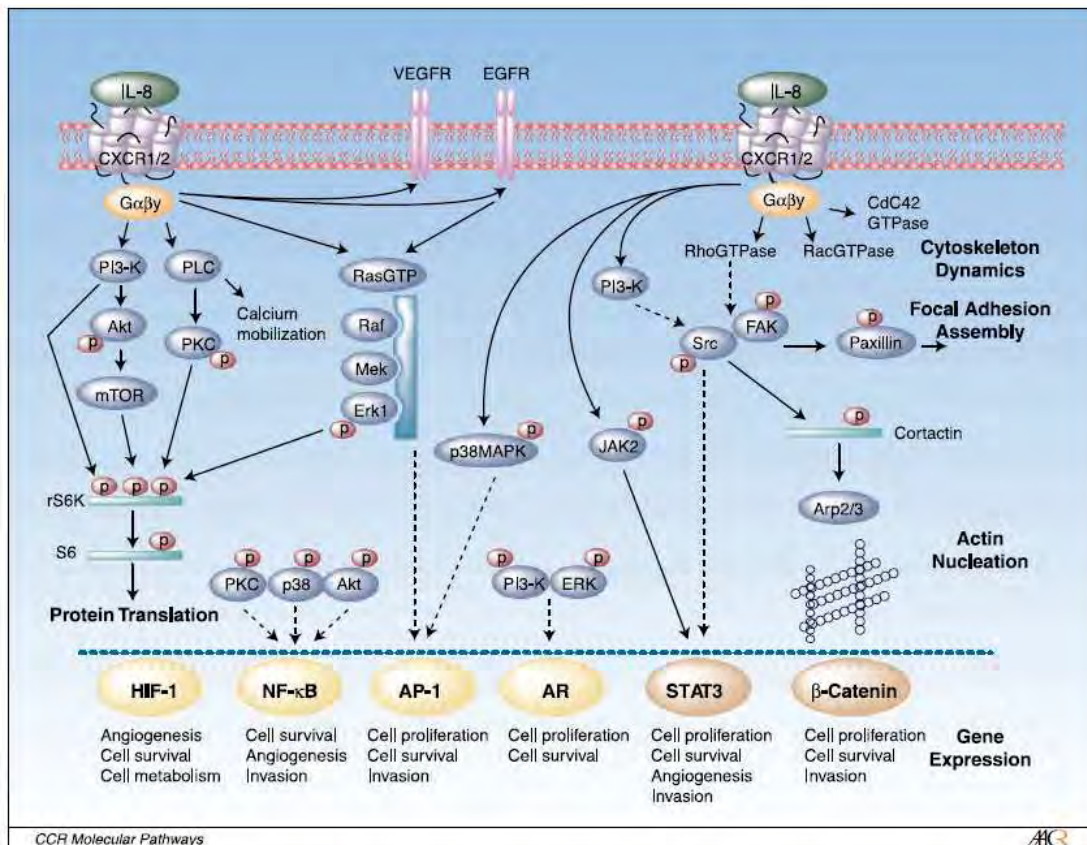
- associated macrophages inhibits M1 inflammatory responses and antitumor resistance. *Cancer research* 66:11432-11440
- Saijonmaa O, Nyman T, Hohenthal U, Fyhrquist F (1991) Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA.hy 926). *Biochemical and biophysical research communications* 181:529-536
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews* 3:721-732
- Semenza GL, Wang GL (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* 12:5447-5454
- Shin YJ, Kim JH, Seo JM, Lee SM, Hyon JY, Yu YS, Wee WR (2009) Protective effect of clusterin on oxidative stress-induced cell death of human corneal endothelial cells. *Molecular vision* 15:2789-2795
- Shojaei F, Ferrara N (2008) Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Drug Resist Updat* 11:219-230
- Shute JK, Solic N, Shimizu J, McConnell W, Redington AE, Howarth PH (2004) Epithelial expression and release of FGF-2 from heparan sulphate binding sites in bronchial tissue in asthma. *Thorax* 59:557-562
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38:73-83
- Sorensen V, Nilsen T, Wiedlocha A (2006) Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 28:504-514
- Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, Noel A (2003) Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22:55-61
- Strebhardt K, Ullrich A (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature reviews* 8:473-480
- Strom TB, Anderson PL, Rubin-Kelley VE, Williams DP, Kiyokawa T, Murphy JR (1990) Immunotoxins and cytokine toxin fusion proteins. *Seminars in immunology* 2:467-479
- Takagi K, Tomita K, Fukushima Y, Chikamoto A, Kanou J, Honda T, Yoshimura H, Nozaki R, Tashiro K, Soma G (1998) Endogenous TNF inducibility and prognosis of colorectal cancer. *Anticancer research* 18:4141-4146
- Taverna S, Gherzi G, Ginestra A, Rigogliuso S, Pecorella S, Alaimo G, Saladino F, Dolo V, Dell'Era P, Pavan A, Pizzolanti G, Mignatti P, Presta M, Vittorelli ML (2003) Shedding of membrane vesicles mediates fibroblast growth factor-2 release from cells. *The Journal of biological chemistry* 278:51911-51919
- Toffoli S, Feron O, Raes M, Michiels C (2007) Intermittent hypoxia changes HIF-1 α phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1 α . *Biochimica et biophysica acta* 1773:1558-1571
- Toffoli S, Michiels C (2008) Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours. *The FEBS journal* 275:2991-3002
- Toffoli S, Roegiers A, Feron O, Van Steenbrugge M, Ninane N, Raes M, Michiels C (2009) Intermittent hypoxia is an angiogenic inducer for endothelial cells: role of HIF-1. *Angiogenesis* 12:47-67
- Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H (1992) A 25 kDa α 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS letters* 314:386-388
- Ucar A, Vafaizadeh V, Jarry H, Fiedler J, Klemmt PA, Thum T, Groner B, Chowdhury K (2010) miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. *Nature genetics* 42:1101-1108
- van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ (2003) Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-

- time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17:1013-1034
- Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M (1987) Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:2292-2296
- Wang X, Lin Y (2008) Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta pharmacologica Sinica* 29:1275-1288
- Waugh DJ, Wilson C (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14:6735-6741
- Willeke F, Assad A, Findeisen P, Schromm E, Grobholz R, von Gerstenbergk B, Mantovani A, Peri S, Friess HH, Post S, von Knebel Doeberitz M, Schwarzbach MH (2006) Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. *Eur J Cancer* 42:2639-2646
- Wouters BG, Koritzinsky M (2008) Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nature reviews* 8:851-864
- Wu Y, Zhou BP (2009) Inflammation: a driving force speeds cancer metastasis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 8:3267-3273
- Wu Y, Zhou BP (2010) TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *British journal of cancer* 102:639-644
- Xiao D, Wang K, Zhou J, Cao H, Deng Z, Hu Y, Qu X, Wen J (2008) Inhibition of fibroblast growth factor 2-induced apoptosis involves survivin expression, protein kinase C α activation and subcellular translocation of Smac in human small cell lung cancer cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40:297-303
- Yoshida N, Ikemoto S, Narita K, Sugimura K, Wada S, Yasumoto R, Kishimoto T, Nakatani T (2002) Interleukin-6, tumour necrosis factor α and interleukin-1 β in patients with renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 86:1396-1400
- Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M (1997) Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor α -dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology* 17:4015-4023
- Yu P, Fu YX (2006) Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86:231-245
- Yu ZX, Biro S, Fu YM, Sanchez J, Smale G, Sasse J, Ferrans VJ, Casscells W (1993) Localization of basic fibroblast growth factor in bovine endothelial cells: immunohistochemical and biochemical studies. *Experimental cell research* 204:247-259
- Zhang SC, Barclay C, Alexander LA, Geldenhuys L, Porter GA, Casson AG, Murphy PR (2007) Alternative splicing of the FGF antisense gene: differential subcellular localization in human tissues and esophageal adenocarcinoma. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85:1215-1228
- Zhang SC, MacDonald KA, Baguma-Nibasheka M, Geldenhuys L, Casson AG, Murphy PR (2008) Alternative splicing and differential subcellular localization of the rat FGF antisense gene product. *BMC molecular biology* 9:10



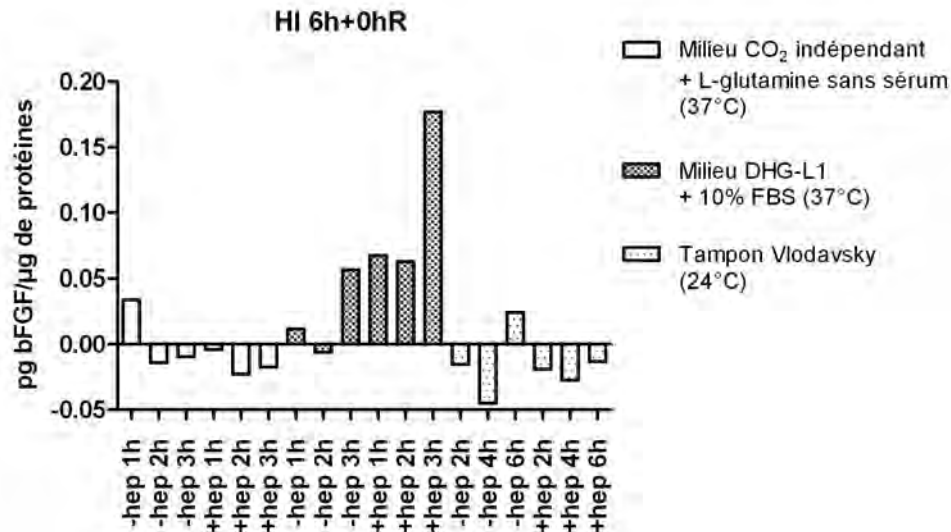
Annexe 1 : Effet du TNF- α sur l'activité relative de liaison de p65 à la séquence κB en N, HC et HI (Résultats de Déborah Desmet).

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI sans TNF- α ou avec TNF- α à deux concentrations différentes à savoir 0,1 ng/ml et 1 ng/ml. Une extraction protéique a alors été réalisée directement après les 6h d'incubation et un TransAM a été effectué avec l'utilisation d'un anticorps primaire spécifique à p65 et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les résultats sont exprimés en activité relative de liaison à l'ADN (normalisation par rapport à la N sans TNF- α).



Annexe 2 : Voies de signalisation induites par l'IL-8 (Wagh and Wilson, 2008).

Ce schéma illustre la grande variété des voies de signalisation qui sont activées par la stimulation des récepteurs CXCR1 et/ou CXCR2 en présence d'IL-8. Après l'activation des petites protéines G hétérotrimériques, la PI3K et la PLC, effecteurs primaires, entraînent l'activation d'Akt et de PKC, la mobilisation du calcium et la cascade de signalisation de la MAPK. Ces voies ont d'une part été montrées pour favoriser la traduction protéique et d'autre part pour réguler l'activité des facteurs de transcription HIF-1, NF- κ B, AP-1, AR, STAT3 et β -caténine. Les voies de signalisation représentées en lignes entières ont été montrées pour être régulées positivement par l'IL-8 via l'utilisation de systèmes rapporteurs. L'IL-8 entraîne notamment la translocation nucléaire de STAT3 et de la β -caténine. Les lignes en pointillé sont des voies supposées par lesquelles l'IL-8 régule l'activité des facteurs de transcription illustrés sur la figure.

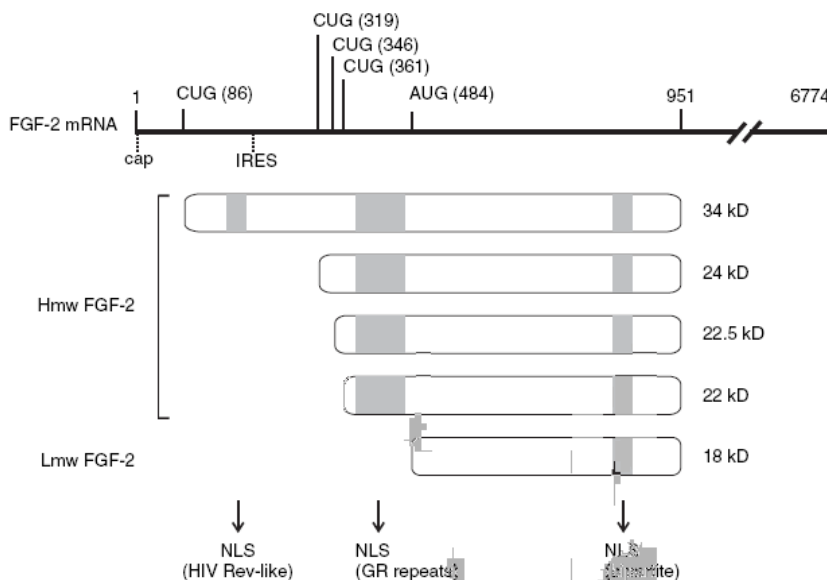


Annexe 3 : Mise au point de la mesure de la sécrétion de bFGF dans le milieu d'incubation des cellules endothéliales avec un ELISA spécifique.

Après 6h d'incubation en HI, le milieu CO₂ indépendant a été remplacé par différents milieux.

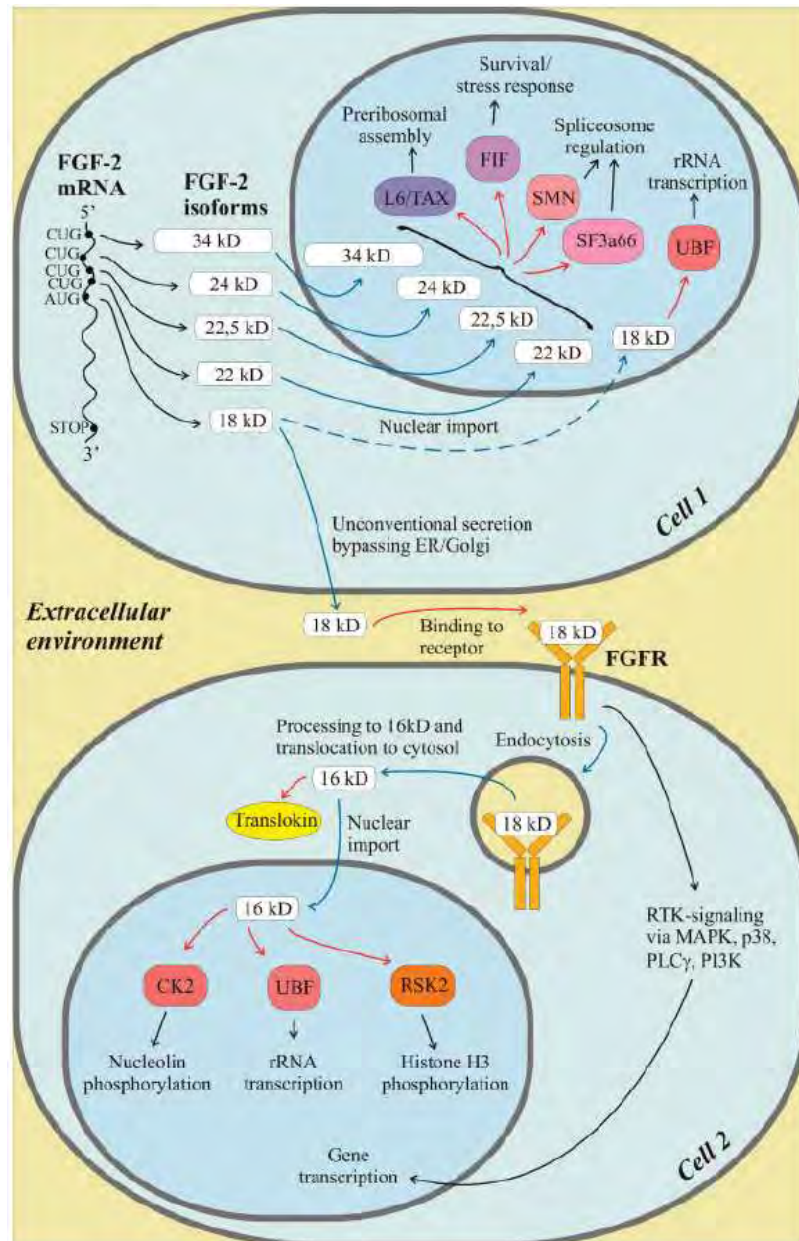
- 1) Le milieu des cellules a été remplacé par du milieu CO₂ indépendant avec ou sans 25 mU/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 1h, 2h ou 3h à 37°C (la concentration en héparinase I, la température et le temps d'incubation ont été repris de l'article de Shute et al. (Shute et al., 2004)).
- 2) Le milieu des cellules a été remplacé par du milieu DHG-L1 contenant 10% de sérum avec ou sans 25 mU/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 1h, 2h ou 3h à 37°C.
- 3) Le milieu des cellules a été remplacé par un tampon particulier dont la composition a été mise au point par Elkin et al. (Vlodavsky est le dernier auteur de l'article) (Elkin et al., 2001) avec ou sans 0,5 µg/ml d'héparinase I et les cellules ont été incubées pendant 2h, 4h ou 6h à 24°C.

Remarque : Composition du tampon de Vlodavsky : 150 mM NaCl, 50 mM de tampon phosphate citrate pH 6,2, 0,2% BSA.



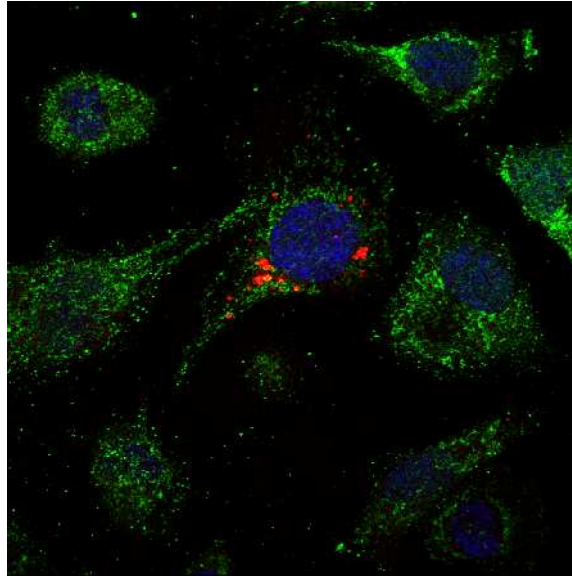
Annexe 4 : Représentation des différentes isoformes humaines du bFGF synthétisées à partir d'un même ARNm (Sorensen et al., 2006).

L'ARNm du bFGF contient quatre sites alternatifs d'initiation de la traduction CUG en amont et en phase avec le codon AUG. Les isoformes de haut poids moléculaire (hmw) de 34, 24, 22,5 et 22 kDa sont initiées à partir de codons CUG tandis que l'isoforme de 18 kDa est initiée à partir du codon AUG de départ. Les formes hmw sont traduites par un mécanisme dépendant d'un IRES excepté la forme 34 kDa dont la traduction est dépendante de la coiffe. Une séquence NLS bipartite est présente dans toutes les isoformes du côté C-terminal. Les formes hmw contiennent en plus un autre domaine du côté N-terminal agissant aussi comme une séquence NLS. La forme 34 kDa contient une autre séquence NLS supplémentaire dans sa partie N-terminale.



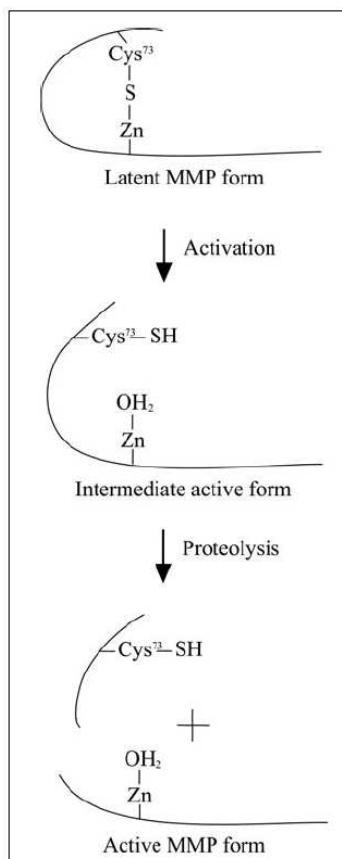
Annexe 5 : Illustrations des localisations subcellulaires des différentes isoformes du bFGF (Sorensen et al., 2006).

Le bFGF produit dans une cellule peut être dirigé dans différents compartiments cellulaires (transport représenté par des lignes bleues) et interagir avec plusieurs molécules (interactions directes représentées par des lignes rouges). Les isoformes du bFGF sont produites par une initiation alternative de la traduction. Les formes de 22 à 34 kDa sont efficacement transportées dans le noyau de la cellule les produisant et s'y accumulent. La forme 18 kDa peut également transloquer dans le noyau. Dans le noyau, le bFGF peut interagir avec L6/TAX qui est impliqué dans la régulation de l'assemblage pré-ribosomal, avec FIF qui est impliqué dans la survie cellulaire, avec SMN et SF3a66 impliqués dans la régulation des spliceosomes. La forme 18 kDa peut interagir lorsqu'elle est dans le noyau avec UBF pour réguler la transcription des ARN ribosomiaux. Seule la forme 18 kDa est exportée dans l'environnement extracellulaire par un mécanisme indépendant de la voie sécrétoire classique impliquant le RE et le Golgi. Le bFGF extracellulaire se lie à son récepteur (FGFR), récepteur à activité tyrosine kinase, présent en surface des cellules cibles et active une cascade de signalisation intracellulaire en induisant la phosphorylation de plusieurs effecteurs, conduisant finalement à la transcription de gènes cibles. Le bFGF lié à son récepteur est également internalisé par endocytose. La forme 18 kDa ainsi internalisée est tronquée pour donner une forme 16 kDa qui est ensuite transportée de l'endosome dans le cytosol. La forme 16 kDa peut alors se lier à la translokine permettant son importation nucléaire où elle peut se lier à la caséine kinase 2 (CK2). La CK2 activée phosphoryle la nucléoline régulant la biogenèse des ribosomes. La forme 16 kDa, comme la forme 18 kDa, peut interagir avec l'UBF régulant la transcription des ARNr. Elle peut aussi interagir avec RSK2, qui en complexe avec le bFGF, phosphoryle l'histone H3 pendant la transition $G_0 \rightarrow G_1$.



Annexe 6 : Co-marquage du bFGF et des lysosomes (image de cellules incubées en HI en présence de TNF- α à 6h+0hR).

Les cellules ont été incubées pendant 6h en N, HC et HI en présence ou non de TNF- α . Après les 6h d'incubation (6h+0hR) ou après les 6h suivies de 16h de réoxygénation (6h+16hR), le milieu CO₂ indépendant a été remplacé par du milieu CO₂ indépendant contenant 100 nM de lysotracker Red et les cellules ont été incubées pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps primaire spécifique au bFGF et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa 488 nm. Le noyau a également été marqué par l'agent intercalant TOPRO-3. Le marquage en immunofluorescence est ensuite observé à l'aide d'un microscope confocal. Le marquage rouge représente les lysosomes, le marquage vert représente le bFGF et le marquage bleu représente les noyaux. Aucune co-localisation n'est observée entre le bFGF (vert) et les lysosomes (rouge) dans aucune des conditions ni à 6h+0hR ni à 6h+16hR. Cependant, étant donné le faible nombre de cellules dont les lysosomes sont marqués avec la sonde lysotracker, l'expérience devra être recommencée pour s'assurer de la fiabilité des résultats obtenus.



Annexe 7: Activation des pro-MMPs (Snoek-van Beurden and Von den Hoff, 2005).

L'activation de la forme latente implique la disruption d'un lien entre un résidu cystéine et une molécule de zinc qui résulte en une forme intermédiaire. Pendant la zymographie, la forme latente se dénature suite à la présence de SDS. La forme pleinement active est générée par clivage protéolytique.

